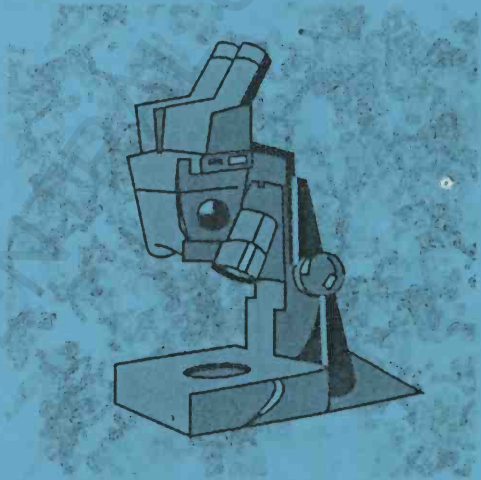
Ion Neacşu Cristian-Sorin Cîmpeanu

BIOLOGIE CELULARĂ

LUCRĂRI PRACTICE

Partea I



UNIVERSITY LIBRARY IASI/CENTRAL

CUPRINS

1.	**MICROSCOPIA FOTONICĂ**	1
1.1.	**Principii şi tipuri de microscopie fotonică**	2
1.1.1.	Formarea imaginilor	2
1.1.2.	Microscopul fotonic obişnuit	6
1.1.3.	Microscopia cu contrast de faza	16
1.1.4.	Microscopia cu interferenţă	21
1.1.4.1.	*Microscopul cu contrast de interferenţă*	21
1.1.4.2.	*Microscopul de interferenţă diferenţială Nomarski*	21
1.1.5.	Microscopia cu fond întunecat (ultramicroscopia)	23
1.1.6.	Microscopia în lumină polarizată	26
1.1.7.	Microscopia cu fluorescenţă	30
1.1.7.1.	*Microscopul cu fluorescenţă*	37
1.1.7.2.	*Microscopul cu imunofluorescenţă*	39
1.1.7.3.	*Microscopul cu lumină fluorescentă transmisă*	39
1.1.7.4.	*Microscopul cu epifluorescenţă (sau cu lumină de excitare incidentă)*	41
1.1.8.	Microscopia în ultraviolet	42
1.1.9.	Alte tipuri de microscoape optice	44
1.1.9.1.	*Stereomicroscopul*	44
1.1.9.2.	*Microscopul inversat*	44
1.1.9.3.	*Sistemul microscop – fotometru*	45
1.1.10.	Anexele microscopului optic	45
1.1.10.1.	*Micrometrul ocular*	45
1.1.10.2.	*Micrometrul obiectiv*	46
1.1.10.3.	*Ocularul cu şurub micrometric*	48
1.1.10.4.	*Aparate de desenat*	49
1.1.11.	Masurători efectuate la microscopul optic	52
1.1.11.1.	*Măsurători în plan orizontal*	53
1.1.11.2.	*Măsurători microscopice în plan vertical*	55
1.1.12.	Determinarea constantelor optice ale microscopului fotonic	55
1.1.12.1.	*Puterea de mărire*	55
1.1.12.2.	*Alte constante optice*	57
1.2.	**Realizarea preparatelor pentru microscopia fotonică. Generalităţi**	58
1.2.1.	Fixarea	59
1.2.2.	Includerea în parafină	60
1.2.3.	Secţionarea	62

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

1.2.4.	Etalarea şi lipirea secţiunilor	63
1.2.5.	Colorarea	63
1.2.6.	Montarea secţiunilor sub lamelă	68
1.3.	**Modele celulare utilizate în microscopia fotonică**	70
1.3.1.	Celule de drojdii (levuri)	70
1.3.1.1.	*Realizarea preparatelor temporare (proaspete) de drojdii*	71
1.3.1.2.	*Realizarea preparatelor permanente de drojdii*	81
1.3.2.	Celule sangvine	85
1.3.2.1.	*Recoltarea sângelui*	85
1.3.2.2.	*Anticoagulanţi*	88
1.3.2.3.	*Numărarea eritrocitelor*	90
1.3.2.4.	*Numărarea leucocitelor*	97
1.3.2.5.	*Numărarea trombocitelor*	99
1.3.2.6.	*Frotiul sangvin*	102
1.3.2.7.	*Metode de colorare*	105
1.3.2.8.	*Examinarea frotiului de sânge. Formula leucocitară*	112
1.3.2.9.	*Măsurarea dimensiunilor celulare*	129
1.3.2.10.	*Anomalii eritrocitare*	136
1.3.2.11.	*Dozarea hemoglobinei*	143
1.3.2.12.	*Hematocritul*	146
2.	**MICROSCOPIA ELECTRONICĂ**	149
2.1.	**Caracterizare generală şi formarea imaginilor în microscopia electronică**	149
2.2.	**Tipuri de microscoape electronice**	154
2.2.1.	Microscopul electronic de transmisie (Transmission Electron Microscope, TEM)	154
2.2.1.1.	*Microscopul electronic de transmisie convenţional (Conventional Transmission Electron Microscope - CTEM)*	155
2.2.1.2.	*Microscopul electronic cu voltaj înalt (Hight Voltage Electron Microscope - HVEM)*	160
2.2.2.	Microscopul electronic analitic de transmisie (Transmission Electron Analytical Microscope - TEAM)	161
2.2.3.	Microscopul electronic de baleiaj (Scanning Electron Microscope - SEM)	162
2.2.4.	Microscopul electronic de transmisie şi baleiaj (Scanning Transmission Electron Microscope - STEM)	167
2.2.5.	Microsonda electronică (Electron Probe Instrument -EPI)	168
2.2.6.	Microscopul ionic analitic	170

BCU KSU LIBRARY UNIVERSITY

2.2.7.	Microscopul cu efect tunel (Scanning Tunelling Microscope - STM)	171
2.2.8.	Microscopul interferometric de baleaj fără apertură (Scanning Interferometric Apertureless Microscope – SIAM)	173
2.2.9.	Microscopul de forţă atomică (Atomic Force Microscope - AFM)	177
2.2.10.	Microscopul confocal de baleiaj cu laser (Laser – Scanning Confocal Scanning Microscope – LSCSM)	178
2.2.11.	Microscopia Raman	179
2.2.12.	Aplicaţii ale microscopiei electronice (ME)	180
2.3.	**Realizarea preparatelor pentru microscopia electronică**	182
2.3.1.	Prelevarea	182
2.3.2.	Fixarea	183
2.3.3.	Spălarea pieselor	187
2.3.4.	Deshidratarea	188
2.3.5.	Includerea	188
2.3.6.	Secţionarea	191
2.3.7.	Montarea secţiunilor ultrafine pe grile	196
2.3.8.	Colorarea preparatelor biologice	198
2.4.	**Îngheţarea, fracturarea şi sublimarea în vid (criofracturarea)**	204

BCU IAŞI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

PREFAŢĂ

Studiul manifestărilor vitale la nivel celular a înregistrat în ultimul timp progrese deosebite, în special prin investigarea ultrastructurilor şi a proceselor celulare şi moleculare. Aceasta a condus la apariţia unei noi ramuri biologice, cu caracter interdisciplinar, fundamental – Biologia celulară şi moleculară, ce reprezintă un domeniu de un mare dinamism, în continuu progres şi de interes deosebit, atât teoretic, cât şi practic.

Dezvoltarea Biologiei celulare şi moleculare a implicat două aspecte importante, strâns corelate între ele: pe de o parte, progresele studiilor de ordin teoretic, fundamental, iar pe de altă parte, perfecţionarea mijloacelor tehnice şi a metodelor de investigare, care au permis cunoaşterea tot mai profundă a structurilor subcelulare şi moleculare şi a proceselor caracteristice materiei vii.

Progresele remarcabile obţinute în cercetarea celulei vii, în special în ultimul deceniu, s-au datorat utilizării unor metode şi mijloace tehnice avansate de studiu, cum sunt: microscopia fotonică – revigorată şi modernizată, microscopia electronică – diversificată prin posibilităţile de investigare până la nivel atomic, difracţia cu raze X, tehnicile de difracţie – dispersie, RMN, spectrofluorimetria, variantele de elctroforeză şi cromatografie, fracţionarea celulelor prin ultracentrifugare diferenţiată, culturile de celule, fuziunea celulară, tehnologia ADN recombinant, biotehnologiile moleculare etc.

BCU "ION CREANGĂ" UNIVERSITY LIBRARY

În acest context, lucrarea de faţă cuprinde o serie de noţiuni teoretice fundamentale şi o gamă de tehnici de microscopie fotonică şi electronică utilizate în investigarea celulelor, reprezentând **partea I** *a manualului de lucrări practice de biologie celulară şi moleculară aflat în curs de finalizare. În* **partea a-II-a** *a acestui manual vor fi prezentate o serie de tehnici clasice şi moderne de fracţionare celulară prin ultracentrifugare (în medii omogene şi cu gradient de densitate), precum şi metode specifice de analiză a structurilor şi componentelor moleculare ale celulelor.*

Prin elaborarea acestei lucrări dorim să înlăturăm o lipsă ce se făcea simţită în activitatea didactică din cadrul disciplinei de Biologie celulară şi moleculară. Totodată, având în vedere multitudinea şi complexitatea aspectelor din acest domeniu, apariţia unei lucrări ample cu un astfel de profil este pe deplin justificată.

Întrucât în ultimii ani au apărut diverse tipuri de microscoape fotonice şi electronice, tot mai perfecţionate, precum şi o bogată literatură referitoare la tehnicile de microscopie, se impune ca necesară şi utilă o prezentare sintetică şi unitară a acestor probleme, de mare actualitate ştiinţifică.

Lucrarea de faţă are un caracter predominant practic, cuprinzând două capitole: MICROSCOPIA FOTONICĂ şi MICROSCOPIA ELECTONICĂ. În fiecare capitol sunt prezentate bazele teoretice necesare înţelegerii şi aplicării tehnicilor de microscopie, urmate de descrierea diferitelor tipuri de microscoape, precum şi de aplicaţiile acestora. De asemenea, sunt redate diferite metode de realizare a preparatelor pentru microscopia fotonică şi electronică, precum şi diversele tehnici de investigare microscopică a unor

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

caracteristici celulare pe două modele celulare larg utilizate: celulele de drojdii şi celulele sangvine. Sunt abordate atât unele metode clasice, realizabile în orce laborator de biologie celulară, cu o dotare minimă, cât şi unele metode moderne de investigare microscopică, având în vedere o dotare de perspectivă.

Lucrarea se adresează, în principal, studenţilor de la specializările de biologie, ecologie şi biochimie din cadrul Facultăţii de Biologie, dar şi celor de la biofizică, medicină umană şi veterinară, precum şi doctoranzilor, cadrelor didactice şi tuturor celor interesaţi de tehnicile de microscopie, preocupaţi de probleme de biologie celulară, citologie, histologie, hematologie, laborator clinic etc.

Pentru sugestiile şi recomandările făcute, privind concepţia şi conţinutul lucrării, precum şi pentru sprijinul acordat în realizarea acesteia, adresăm sincere mulţumiri membrilor Comisiei de analiză şi colectivului Catedrei de Biologie Animală a Facultăţii de Biologie.

De asemenea, vom fi recunoscători tuturor celor care ne vor oferi sugestii şi observaţii, în vederea îmbunătăţirii şi completării prezentei lucrări.

Autorii

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

1. MICROSCOPIA FOTONICĂ

Cunoaşterea organizării ultrastructurale a celulei şi a diferitelor subcomponente celulare, până la nivel molecular şi submolecular, a devenit posibilă în ultimul timp datorită utilizării unor mijloace tehnice şi metode de studiu tot mai perfecţionate. Astfel, s-au acumulat numeroase date în biologia celulară şi moleculară prin utilizarea unor tehnici de studiu morfologice, biochimice, biofizice, funcţionale, cum sunt cele de: *microscopie optică şi electronică, difracţie cu raze X, rezonanţă magnetică nucleară, spectrofluorimetrie, autoradiografie, ultracentrifugare, electroforeză, cromatografie, culturi celulare, fuziuni celulare, tehnica ADN recombinant*, etc.

Structurile celulare au dimensiuni extrem de mici, unităţile de măsură utilizate pentru măsurarea lor fiind: **micrometrul** (μm) = 10^{-6} m, **nanometrul** (nm) = 10^{-9} m, **Ångströmul** (Å) = 10^{-10} m. In prezent se utilizează în mod obişnuit nanometrul (**Fig. 1**).

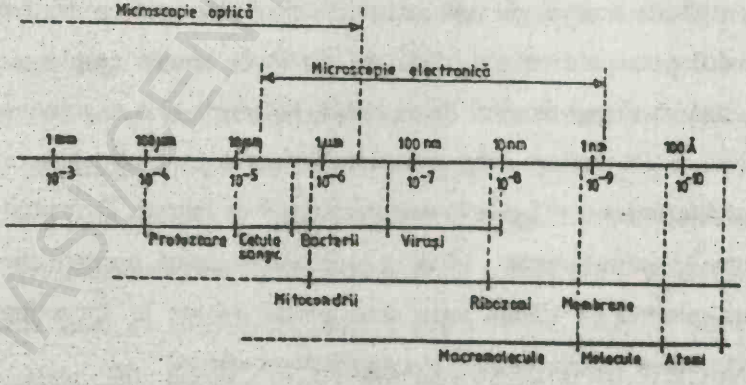


Fig. 1. Domenii de studiu în microscopia optică şi în cea electronică (după Isac, 1978)

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Dintre tehnicile morfologice folosite pentru studiul celulei, **microscopia fotonică (optică)** reprezintă o primă etapă, intens utilizată şi în prezent.

1.1. Principii şi tipuri de microscopie fotonică

1.1.1. Formarea imaginilor

Microscopul fotonic (optic) este un aparat de mărit, care utilizează *lumina* (fotonii din radiaţia electromagnetică) drept sursă de iluminare, pentru studiul diferitelor obiecte, care nu se pot observa cu ochiul liber.

Distanţa minimă la care doua puncte se pot observa distinct se numeşte **distanţă separatoare minimă sau putere de rezoluţie** (D_o, **D** sau d_o). Rezoluţia ochiului uman este de 0,1mm, adică la distanţa minimă a vederii normale, de 25 de centrimetri, ochiul distinge separat două puncte situate la o distanţă minimă de 0,1 mm unul faţă de celălalt.

Microscopul permite diminuarea acestei valori. Unghiul format de razele de lumină ce pleacă de la aceste două puncte şi se întâlnesc pe retina ochiului este de un minut. Dacă acest unghi este mai mic, cele două puncte se confundă, adică nu mai pot fi percepute separat, deoarece razele de lumină ce pleacă de la ele impresionează un singur receptor de pe retină, formându-se o imagine unică. Cele două imagini se pot distinge separat dacă se formează pe două celule retiniene cu conuri separate printr-o altă celulă, neimpresionată de lumină. Diametrul unui con este de 4μm. La această distanţă (4μm) a proiecţiei pe retină, corespunde o distanţă separatoare minimă de 0,1mm între două puncte situate la 25cm faţă de ochi (distanţa minimă a vederii normale sau *punctum proximum*).

Unghiul vizual format de razele de lumină ce vin la ochi, de la extremităţile unui obiect, este direct proporţional cu mărimea obiectului şi invers

proporţional cu distanţa dintre obiect şi ochi. Pentru observarea obiectelor cu dimensiuni mici, este necesar să se mărească unghiul vizual. Aceasta se poate realiza fie apropiind obiectul de ochi, ceea ce are o limită naturală (limita puterii de separare a ochiului), fie prin utilizarea lentilelor, simple sau integrate în sistemul optic al unui microscop.

Fiecare lentilă are o putere de separare dată de capacitatea ei de a forma imagini distincte pentru două puncte situate la distanţa separatoare minimă (D_c). Această distanţă este direct proporţională cu lungimea de undă a razelor de lumină utilizate si invers proporţională cu apertura numerică a obiectivului microscopului.

Apertura numerică (AN) este dată de produsul dintre sinusul unghiului format de raza cea mai oblică ce pătrunde în obiectiv, cu axa optică a microscopului şi indicele de refracţie al mediului aflat între preparat şi obiectiv:

$$AN = n \sin \alpha$$

- n = unghiul de refracţie al mediului;
- α = unghiul format de raza cea mai oblică şi axa optică a microscopului.

Valoarea unghiului α poate fi cel mult 90^0, astfel că sin 90^0=1.

Indicele de refracţie pentru aer, n, este 1, deci, dacă între obiectiv şi preparat este aer, AN=1. Astfel de obiective, în contact cu aerul, se numesc **obiective uscate**. AN pentru obiectivele uscate poate fi egală cel mult cu 1, dar în practică s-au realizat obiective uscate cu AN=0,95.

Dacă între obiectiv şi preparat se interpune un lichid, se obţin **obiective de imersie**. Astfel de obiective au AN mai mare de 1, deoarece α pentru lichide are o valoare mai mare de 1. Exemple: pentru *apa distilată*, n=1,33, iar AN=1,33 x 1=1,33 (practic 1,20); pentru *ulei de cedru*, n=1,51, iar AN=1,51 x 1=1,51 (practic 1,4); pentru *ulei de parafină*, n=1,47; pentru *ulei de ricin*, n=1,48, etc.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Microscopul fotonic are în componența sa un **sistem de lentile convergente (biconvexe și planconvexe)**. Dacă obiectivul se află în fața unei lentile convergente, la o distanță mai mare decât distanța focală a lentilei, de cealaltă parte a lentilei se va forma o *imagine reală, mărită și răsturnată*, la întâlnirea razelor refractate, cu axele secundare.

Dacă obiectul se afla între lentilă și focar, imaginea obiectului se formează în fața lentilei (în spatele obiectivului), aceasta fiind *mărită, dreaptă și virtuală*.

Microscopul fotonic are două sisteme de lentile: **obiectivul**, în fața căruia se așează preparatul, și **ocularul** prin care se privește imaginea proiectată de obiectiv. Imaginea finală obținută la microscop, prin cele două sisteme de lentile, este *mărită, virtuală si răsturnată*, față de obiectiv.

Puterea de mărire totală (G) a microscopului este egală cu produsul dintre mărirea dată de obiectiv și cea dată de ocular. Mărirea maximă posibilă dată de un microscop obișnuit este de 1500x, obținută cu un obiectiv cu mărirea de 100x și un ocular ce mărește de 15x. La microscoapele binoculare de adaugă și puterea **de mărire a dispozitivului de îmbinare a ocularelor**:

$$G = g\,ob \times g_1\,oc \times g_2$$

- G = puterea de mărire totală a microscopului;
- g ob = puterea de mărire a obiectivului;
- g_1 oc = puterea de mărire a ocularului;
- g_2 = puterea de mărire a dispozitivului binocular.

De asemenea, puterea de mărire a microscopului se poate aprecia și prin valoarea parametrului numit **grosisment (mărirea unghiulară sau puterea măritoare unghiulară)**. Grosismentul reprezintă raportul dintre unghiul sub care se vede un obiect cu ajutorul instrumentului și unghiul sub care se vede obiectul cu

ochiul liber:

$$a'/a = d/f$$

- a' = unghiul vizual al imaginii (la microscop);
- a = unghiul vizual al obiectivului (cu ochiul liber);
- d = distanţa minimă a vederii clare a ochiului (25 cm);
- f = distanţa focală a instrumentului optic.

Puterea de mărire poate fi dată şi de raportul dintre lungimea liniară a imaginii şi lungimea (mărimea) liniară a obiectului :

$$i/o = d/f$$

- i = mărimea liniară a imaginii;
- o = mărimea liniară a obiectului.

Rezoluţia microscopului (D_o) se calculează după formula lui Abbé:

$$D_o = 0{,}61\lambda / n \sin \alpha$$

- λ = lungimea de undă a radiaţiei folosite la formarea imaginii;
- n sin α este AN a lentilei obiectivului (în care n şi α au semnificaţia arătată anterior).

O rezoluţie cât mai bună (D_o cât mai mic) se poate obţine prin utilizarea de radiaţii cu λ mică (raze UV la microscopul optic cu UV, sau flux de electroni la microscopul electronic) si n mai mare. Rezoluţia microscopului optic este de 0,3 µm fără imersie, de 0,2µm cu imersie şi de 0,1µm la microscopul cu UV.

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

In funcţie de dispozitivele optice utilizate şi de modalităţile de formare a imaginii, se disting mai multe variante (tipuri) de microscoape fotonice:

- **microscopul fotonic obişnuit**, care poate utiliza două metode de iluminare a preparatului: *iluminare prin transparenţă* (Durchlicht) şi *iluminare prin reflexie* (Auflicht);
- **microscopul cu contrast de fază;**
- **microscopul cu lumină polarizată;**
- **microscopul cu fond întunecat (ultramicroscop);**
- **microscopul cu fluorescenţă;**
- **microscopul cu lumină ultravioletă;**
- **stereomicroscopul;**
- **microscopul de interferenţă diferenţială Nomarski (DIC);**
- **microscopul optic inversat;**

1.1.2. Microscopul fotonic obişnuit

Microscopul optic obişnuit este constituit din trei părţi principale: partea mecanică, sursa de lumină şi dispozitivul de transmisie şi reglare a luminii (partea optică) (Fig. 2).

A] **Partea mecanică sau stativul**, reprezintă suportul metalic pentru partea optică şi sursa de lumină si este alcătuit din **picior** şi **coloană**.

a. **Piciorul** sau **talpa** asigură stabilitatea aparatului şi este suport pentru sursa de lumină, oglinda proiectoare şi o diafragmă.

b. **Coloana** este partea verticală a microscopului, ataşată la picior printr-o articulaţie mobilă, de obicei, pe ea fiind montate platina (măsuţa microscopului), tubul, dispozitivul de reglare a imaginii şi revolverul cu obiectivele.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- Platina este suportul pe care se fixează lamele de sticlă cu preparatul de examinat. Este aranjată perpendicular pe axa optică à microscopului şi are în mijloc o deschidere pentru trecerea fasciculului luminos de la sursă la preparat. Platina se poate deplasa în plan orizontal cu ajutorul a două *şuruburi* (*vize*) laterale, pentru reglarea poziţiei preparatului faţă de obiectiv. Pe faţa superioară se găsesc două *cleme* (*valeţi*) pentru fixarea *portobiectului* (lama cu preparat) şi o *riglă gradată* pentru reperarea unor detalii de pe preparat.

- Tubul reprezintă suportul pentru sistemul optic: *ocularul* în partea superioară şi *obiectivul* în partea inferioară. Pe părţile laterale, tubul este conectat la *dispozitivul de reglare a imaginii*, format din 1-2 perechi de *şuruburi* sau *vize*: cea *macrometrică*, pentru deplasări majore şi cea *micrometrică*, pentru deplasări fine, în vederea obţinerii unei imagini clare.

Revolverul este un dispozitiv rotativ pe care se montează obiectivele, plasate la partea inferioară a tubului. La microscopul românesc ML 4, pe revolver se ataşează prin filet, 5 obiective cu putere de mărire crescândă, dar alte tipuri de microscoape pot avea 4-7 obiective.

B] Partea optică este alcătuită din sistemul ocular şi cel obiectiv.

a. Sistemul ocular este reprezentat de două lentile montate într-un tub metalic scurt, ce se ataşează la tubul microscopului. Există un singur ocular – la *microscopul monocular* sau două oculare – la *microscopul binocular*, care este dotat şi cu un singur sistem optic intermediar de îmbinare a celor două oculare, având putere de mărire proprie (de ex. 1,5x).

Ocularul are rol de a mări imaginea reală dată de obiectiv, transformând-o în imagine virtuală, mărită. Microscopul ML 4, de exemplu, are oculare care măresc de 5x, 7x, 10x, 15x.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

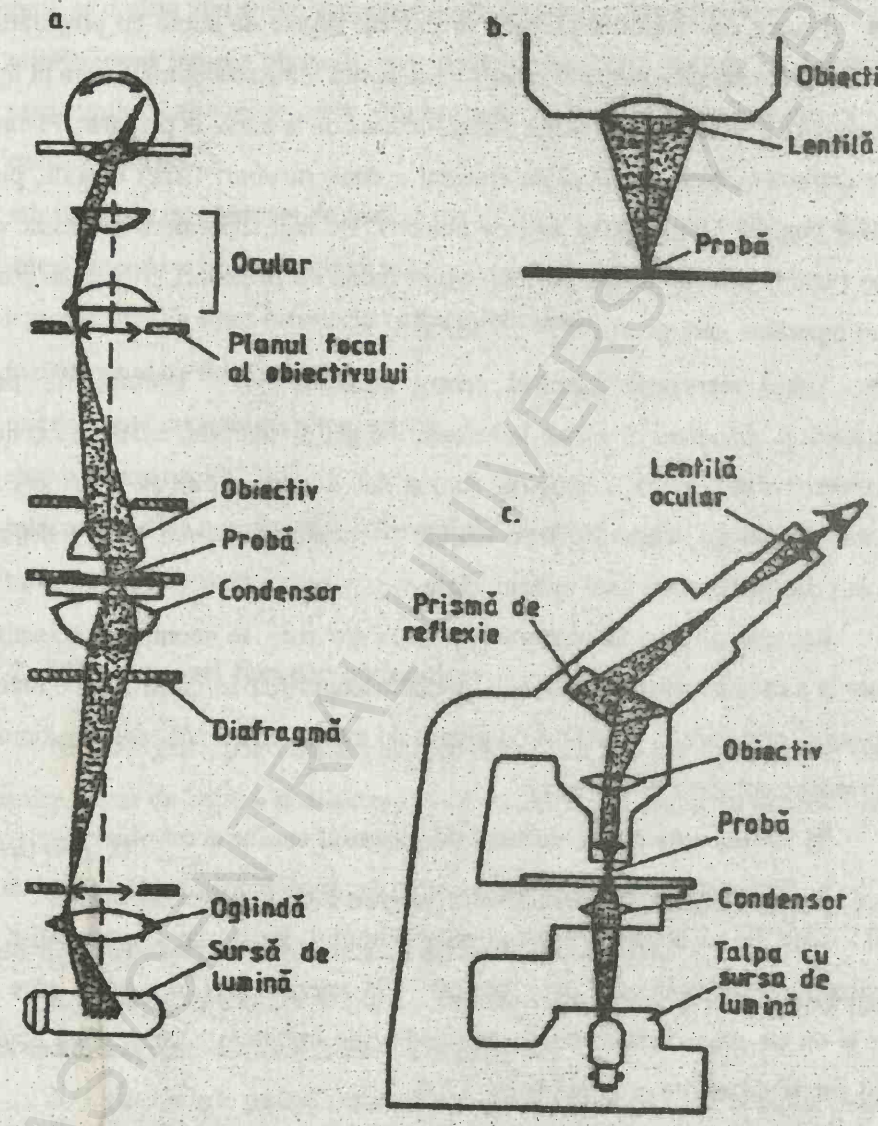


Fig. 2. Microscopul optic: a - partea optică; b - unghiul de apertură; c - aspect general (după Karp, 1984)

BCU ASSOCIATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Există trei tipuri de oculare: Huygens, Ramsden şi ocularul compensator.

- Ocularul Huygens este cel mai utilizat tip de ocular în laboratoare. Este format din două lentile plan-convexe, având convexitatea spre obiectiv: lentila ocular sus şi lentila colectoare în partea inferioară, aceasta având distanţa focală dublă faţă de lentila ocular. Imaginea se formează în planul focal al lentilei oculare, unde se află şi o diafragmă fixă, care limitează câmpul imaginii. Acest ocular nu se poate utiliza ca lupă şi se numeşte ocular negativ.

- Ocularul Ramsden este format din două lentile plan-convexe care au curbura spre interiorul monturii. Diafragma se află în faţa lentilei distale, unde se formează şi imaginea. Acest tip de ocular se poate utiliza ca lupă si se numeşte ocular pozitiv. In prezent este puţin utilizat.

- Ocularul compensator este un tip special de ocular, prezentând *aberaţie cromatică* (refracţia inegală a luminii), care face ca imaginea dată de razele roşii să fie mai mare decât cea dată de razele albastre.Se utilizează numai cu *obiectivele de tip apocromat*, la care razele albastre-violete din spectru sunt mai puternic refractate decât cele roşii, imaginea fiind neclară şi cu franjuri colorate. Aceasta aberaţie cromatică se corectează cu ocularul compensator, la care refracţia (aberaţia) razelor roşii si albastre este opusă faţă de cea de la obiectivul apocromat. Este notat cu litera K.

Oculare speciale. Pentru anumite operaţii la microscopul optic, se pot utiliza şi oculare speciale.

- Oculare proiective – sunt astfel realizate încât pot reda un câmp cât mai plan al imaginii şi se folosesc la microfotografie.

- Oculare pentru microproiecţii se utilizează pentru proiectarea imaginii pe un ecran. Sunt notate cu **Pr**.

B.C.U. „M. EMINESCU" IAŞI

- Oculare de desenat sunt alcătuite dintr-un ocular obişnuit combinat cu o cameră clară.
- Oculare micrometrice au în planul diafragmei o reţea micrometrică, utilizându-se la măsurători microscopice în plan orizontal.
- Microscopul ocular este compus din două sisteme de lentile cu distanţă reglabilă şi este utilizat pentru centrarea dispozitivului contrast de fază, putându-se fixa la distanţa (adâncimea) dorită, cu un şurub lateral. Este notat cu indicaţia **Ph** (cu roşu).

Notarea ocularelor. Pe montura superioară a ocularelor se găsesc notate o serie de cifre şi litere, cu următoarea semnificaţie:

- o cifra urmată de semnul x (ori) arată puterea de mărire a ocularului. De ex., microscopul ML 4 are ocularele: 5x, 7x, 10x si 15x.

- o cifră încercuită indică mărirea câmpului imaginii;

- o serie de litere care arată tipul ocularului: **A**=acromat; **P**=planacromat; **Pr**=proiectiv; **K**=ocular compensator; **Ph** (cu roşu)= contrast de fază.

b. Sistemul obiectiv este compus dintr-o îmbinare de lentile convergente montate într-o anumită ordine într-un tub metalic care se înfiletează în capul revolver. Lentila inferioară este plan convexă, orientată cu faţa plană spre preparat şi se numeşte lentila frontală. Obiectivul dă o imagine reală, răsturnată şi mărită a obiectului.

Se utilizează două categorii de obiective: uscate – cu putere de mărire la microscopul ML 4 de 6x, 10x, 20x si 40x şi obiective cu imersie (de ex., cu ulei de cedru), cu putere de mărire 90x.

Proprietăţile lentilelor care alcătuiesc sistemul optic al microscopului sunt:

➢ *Unghiul de deschidere* (2d) reprezintă unghiul sub care se vede diametrul obiectivului, dintr-un punct dat si este format din conul de raze luminoase ce

pornesc de la obiect si intră în obiectiv. El este cu atât mai mare cu cât distanța focală a obiectivului este mai mică (obiectul fiind mai apropiat de obiectiv). Puterea de rezoluție și claritatea imaginii sunt cu atât mai bune, cu cât unghiul de deschidere este mai mare. Razele marginale produc aberații, de aceea ele sunt eliminate printr-o diafragmă fixă plasată între lentila distală și focarul superior al obiectivului.

➢ *Apertura numerică* (AN) este produsul dintre sinusul unghiului format de raza cea mai oblică ce intră în obiectiv cu axa optică a microscopului (α) și indicele de rezoluție al mediului aflat între preparat și obiectiv: $AN = n \cdot \sin \alpha$ (descrisă mai sus).

➢ *Aberația sferică* (de sfericitate) este dată de faptul că lentilele convergente nu refractă toate razele într-un singur focar, razele paralele de la marginea obiectivului fiind refractate mai puternic decât cele din zona axială a lentilei, iar imaginea obiectului are conturul neclar. Corecția se poate face printr-o diafragmă care reține razele marginale sau prin asocierea de lentile convexe (convergente) puternice, făcute din sticlă cu indice de refracție mare, cu lentile concave (divergente) slabe, din sticlă cu indice de refracție mic.

➢ *Aberația cromatică* rezultă din refracția inegală a luminii de diferite lungimi de undă: razele violete sunt refractate mai puternic decât cele roșii, de către lentilele obiectivului. Astfel, imaginea este neclară și înconjurată de franjuri colorate. Corecția se realizează cu oculare compensatoare cum s-a descris mai sus sau prin asocierea de lentile realizate din sticlă diferită: sticlă din crown ce conține silicați de potasiu și calciu și sticlă din flint formată din silicați de potasiu și plumb. Sticla din crown este mai puțin refringentă și deci, mai puțin dispersantă decât sticla din flint.

BCU IASI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Prin asocierea a două lentile, una din crown şi una din flint, se corectează aberaţia cromatică, obţinându-se un focar comun pentru razele din domeniu albastru-violet şi cel roşu, imaginea fiind mult clarificată. Astfel de obiectiv (cu două lentile diferite) se numesc acromate.

Dacă pentru corectarea aberaţiei cromatice se folosesc trei lentile suprapuse, una din crown şi două din flint, se obţine un focar comun pentru trei radiaţii (roşu, verde şi violet), iar aberaţia este eliminată aproape complet. Astfel de obiective se numesc apocromate.

TABEL I. Puterea de rezoluţie în microscopia optică şi în microscopia electronică (după Isac, 1978)

Domeniul	Lungimea de undă (λ)	Apertura (n sin α)	Puterea de rezoluţie (D)
Microscopia optică	450 nm (albastru) 750 nm (roşu)	n sinα = 1,0 n sinα = 1,0	D = 450 nm D = 750 nm
Microscopia electronică	0,01 nm (U =10 kV) 0,004 nm (U =100 kV) 0,001 nm (U =1000 kV)	n sinα = 10^{-3} n sinα = 10^{-3} n sinα = 10^{-3}	D = 10 nm D = 4 nm D = 1 nm

Alte calităţi ale obiectivelor sunt: *puterea de separare* (sau *de rezoluţie*, prezentată mai sus), *puterea de definiţie* (calitatea de a reda imagini cu contur cât mai precis, prin corectarea aberaţiilor), *puterea de penetraţie* sau *de profunzime* (calitatea de a reda clar cât mai multe planuri ale obiectivului). Cu cât un obiectiv este mai puternic, cu atât puterea de penetraţie este mai mică, dar acest impediment se poate elimina prin creşterea sensibilităţii vizei micrometrice, care permite astfel observarea preparatului plan cu plan, în profunzime.

BCU "ASACHI" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

O altă calitate este *luminozitatea obiectivului*, dată de raportul dintre intensitatea luminoasă a obiectivului şi cea a imaginii. Este cu atât mai bună, cu cât apertura numerică este mai mare.

Clasificarea obiectivelor. Există mai multe tipuri de obiective, în funcţie de modul de corecţie şi natura mediului dintre obiectiv şi preparat.

- După corecţie – *obiective acromate*, *apocromate*, *planacromate* şi *monocromate*. Cele acromate şi apocromate au fost deja descrise.

Obiectivele planacromate sunt astfel corectate încât au o luminozitate egală pe toată suprafaţa câmpului. Se folosesc pentru microfotografii.

Obiectivele monocromatice – sunt corectate numai pentru lungimea de undă de 275 nm. Au apertura numerică de 1,25 şi o putere de rezoluţie de două ori mai bună decât obiectivele obişnuite. Se folosesc exclusiv pentru fotografierea în lumina UV.

- După mediul prezent între obiectiv şi preparat – există *obiective uscate* şi *obiective cu imersie*, prezentate deja anterior, când s-a descris apertura numerică. *Obiectivele uscate* au AN cu o valoare de cel mult 0,95 (teoretic, ANmaximă=1), iar cele *cu imersie* au AN mult mai mare, în funcţie de natura lichidului dintre obiectiv şi preparat, prezentând puterea de mărire (90x) şi cea de rezoluţie mai mare decât la obiectivele uscate, precum şi o imagine mai luminoasă.

Notarea obiectivelor. Obiectivele au notate pe montura metalică o serie de litere şi cifre care semnifică principalele lor caracteristici.

Prima cifră reprezintă puterea de mărire: 5x, 10x, 20x, 40x sau 90x (ori 100x). Urmează o linie de refracţie şi a doua cifră care reprezintă apertura numerică. Cifra a treia redă lungimea tubului microscopic, iar cifra a patra reprezintă grosimea lamei pentru care s-a făcut corecţia (numai la obiectivele cu

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

imersie şi cele uscate puternice). Toate obiectivele sunt acromate. Cele apocromate sunt notate APOCHROMAT, iar cele planacromate – PLANACHROMAT.

Obiectivele pentru contrast de fază au indicaţia **Ph** notată cu roşu, iar cele pentru lumină polarizată cu inscripţia **Pol**.

Obiectivele cu imersie pentru ulei de cedru au inscripţia **H1** sau **OI**.

C] Sistemul de iluminare

Acest dispozitiv cuprinde: **sursa de lumină, dispozitivul de transmisie** şi **condensatorul**.

a. Sursa de **lumină** este reprezentată de lumina naturală sau artificială. Lumina artificială este generată de o lampă de 6V alimentată de un transformator şi montată în talpa microscopului.

Iluminarea pentru alte tipuri de microscoape optice se poate face cu arc voltaic (pentru câmp întunecat, fluorescenţă, UV, microproiecţie), sau cu lămpi cu vapori de mercur,HBO 50 – 100 – 200 (pentru UV, fluorescenţă, microfotografie).

b. Dispozitivul de transmisie este reprezentat de o oglindă plană situată în talpă şi reglată cu două şuruburi. Poate fi şi o oglindă plan-convexă mobilă montată pe un suport exterior. Are rolul de a dirija lumina în axul optic al microscopului. Pot exista şi piese de reglare şi focalizare, ca lentilă, diafragmă, prismă, filtre de lumină.

c. Condensatorul este un sistem de lentile într-o montură mobilă pe verticală, ce se află sub platină şi are rolul de a focaliza lumina pe preparatul examinat. Iluminarea optimă se obţine prin corectarea aperturii numerice a condensatorului cu cea a obiectivului, realizată cu ajutorul unei diafragme de tip iris, numită diafragmă de apertură. Aceasta reglează conul luminos astfel încât el să fie egal cu apertura obiectivului utilizat. Cel mai utilizat este condensatorul Abbé, dar există şi alte tipuri mai complexe.

BCU BIBLIOTECA CENTRALĂ UNIVERSITARĂ LIBRARY

Modul de lucru

Presupune operaţii necesare pentru punerea la punct a imaginii şi observarea în condiţii optime a preparatului:

- ✓ se face legătura sursei de lumină la transformator care se conectează la reţeaua de curent electric (220V);
- ✓ se alege un ocular de mărire mică sau mijlocie şi apoi se aduce în axul optic al microscopului un obiectiv slab, de 10x, prin rotirea revolverului;
- ✓ se coboară condensatorul, privind prin oculare până la obţinerea unei iluminări uniforme, de intensitate potrivită;
- ✓ se aşează pe platină lama port-obiect cu lamela în sus şi se fixează cu ajutorul valeţilor;
- ✓ se aduce preparatul (obiectul) în axa optică, deplasând platina cu ajutorul şuruburilor laterale;
- ✓ privind lateral, se coboară tubul cu ajutorul vizei macrometrice, până la o distanţă mai mică decât distanţa focală a obiectivului (înscrisă pe obiectiv: 16mm la obiectivul 10x, 8mm la obiectivul 20x, 4mm la obiectivul 40x);
- ✓ privind prin ocular, se ridică încet sistemul optic cu ajutorul vizei macrometrice, până la apariţia imaginii în câmpul microscopului. Dacă imaginea nu apare,înseamnă că obiectivul nu se află în axul optic sau preparatul nu se află în câmpul microscopului, ori am ridicat prea repede tubul. Pentru corecţie se reia operaţia;
- ✓ prin rotirea în ambele sensuri a vizei micrometrice se obţine o imagine clară şi luminoasă a preparatului;
- ✓ se fixează distanţa interpupilară a examinatorului prin mişcarea laterală a celor două tuburi oculare, până când se vede o singură imagine clară, cu ambii ochi.

BCU "IOSIF CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Recomandări

✓ nu este bine să se caute imaginea prin coborârea tubului, deoarece se pot deteriora lama şi lentila obiectivului;

✓ se recomandă ca în timpul observării să se ţină permanent mâna pe viza micrometrică ce trebuie mişcată continuu, pentru menţinerea unei imagini clare a preparatului care nu are o grosime uniformă;

✓ pentru examinarea cu obiectivele 20x, 40x sau cu imersie se roteşte revolverul, aducând obiectivul dorit în axul optic, fără a mişca şurubul macrometric, iar condensatorul se ridică pentru o iluminare corespunzătoare;

✓ pentru claritatea imaginii cu obiectivele mari, se utilizează numai viza micrometrică;

✓ la utilizarea obiectivului cu imersie (90x) se ridică la maximum condensatorul, iar diafragma iris se deschide complet. Pe preparatul de pe lama port-obiect se pune o picătură de ulei de cedru, cu tubul ridicat. Se aduce în axul optic obiectivul de imersie şi privind lateral, se coboară lent tubul cu ajutorul vizei macrometrice, până când lentila frontală a obiectivului atinge picătura de ulei de cedru. Privind prin ocular, se pune la punct imaginea utilizând iniţial viza macrometrică şi apoi cea micrometrică. La sfârşitul examinării, se ridică tubul microscopului cu 1–2cm, se îndepărtează lama de pe platină şi se şterge uleiul de cedru de pe lentila obiectivului, cu vată îmbibată în xilol sau benzen;

✓ după folosire, microscopul se deconectează de la reţea, se acoperă cu o husă pentru protecţie

1.1.3. Microscopia cu contrast de faza

Lumina care străbate structurile celulei vii întâmpină o rezistenţă diferită de la o structură la alta. Din această cauză razele luminoase suferă o încetinire

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

(defazare) față de razele directe, nedetectabilă cu ochiul liber sau aparatul de fotografiat. Acest fenomen se poate vizualiza la microscopul cu contrast de fază (Fig.3).

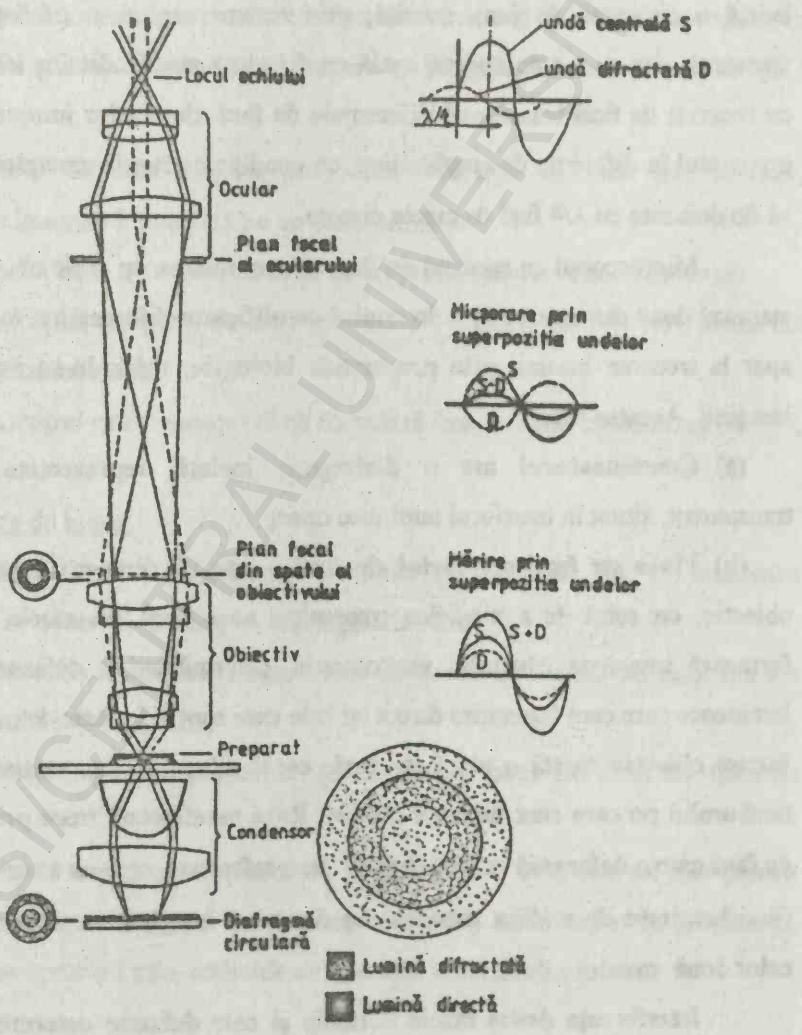


Fig. 3. Schema de principiu a microscopului cu contrast de fază (după Karp, 1984)

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tehnica microscopiei în contrast de fază a fost pusă la punct de către **Zernike în 1930** (premiul Nobel în 1953). Aceasta permite observarea structurilor biologice în stare vie, fără fixare şi colorare, care sunt de obicei transparente şi nu se pot observa în microscopia optică obişnuită. Dacă între două oscilaţii luminoase există o diferenţă de fază, rezultă, prin însumarea lor, o oscilaţie de aceeaşi frecvenţă, dar cu o amplitudine egală cu diferenţa amplitudinilor lor. Microscopul cu contrast de fază transformă diferenţele de fază ale razelor luminoase ce străbat preparatul în diferenţe de amplitudine, cu condiţia ca razele care străbat preparatul să fie defazate cu $\lambda/4$ faţă de razele directe.

Microscopul cu contrast de faza este un microscop optic obişnuit la care se ataşează două dispozitive care determină amplificarea diferenţelor de drum optic ce apar la trecerea luminii prin preparatele biologice, mărindu-se astfel contrastul imaginii. Acestea sunt:

(a) **Condensatorul** are o diafragmă, inelară, reprezentată de un inel transparent, situat în interiorul unui disc opac;

(b) **Placa de fază sau inelul de fază** - este un dispozitiv special plasat în obiectiv, cu rolul de a modifica transmisia unei părţi din razele luminoase ce formează imaginea câmpului microscopic, determinând o defazare între razele luminoase care sunt transmise direct şi cele care sunt difractate de preparat. Pentru fiecare obiectiv există o placă de fază, ce se aduce în raza optică, prin rotirea tamburului pe care sunt montate plăcile. Raza nerefractată trece prin inelul plăcii de fază care o defazează cu $\lambda/4$ faţă de raza refractată, care nu trece prin acest inel (λ = lungimea de undă a luminii). La formarea imaginii se produce interferenţa celor două raze.

Interferenţa dintre razele normale şi cele defazate determină o mărire a contrastului la limita dintre două zone cu indici de refracţie ce diferă foarte puţin.

Microscopul cu contrast de fază face ca diferenţele de fază invizibile pentru ochi să fie transformate în diferenţe de amplitudine, care măresc contrastul structurilor. Ca urmare, apare un halou care accentuează contrastul imaginii, permiţând observarea unor detalii invizibile la microscopul optic obişnuit.

Există două tipuri de contrast de fază:

- contrastul de fază este *pozitiv* când razele directe şi cele difractate ajung în aceeaşi fază în planul imaginii, când apare o imagine luminoasă pe un fond întunecat;
- contrastul de fază este *negativ* dacă diferenţa de fază este de $\lambda/4$, obţinându-se o imagine întunecată pe un fond luminos.

Pe această bază s-au realizat două tipuri perfecţionate de microscoape:

(a) **Microscopul anoptral** cu contrast de fază negativ, mai sensibil decât cel cu contrast de fază obişnuit.

(b) **Microscopul cromoanoptral** ce formează imagini atât cu contrast pozitiv, cât şi negativ.

Tehnica de lucru:

✓ se îndepărtează condensatorul obişnuit şi în locul lui se montează condensatorul de contrast de fază, cu diafragmă inelară;

✓ la revolver se înşurubează obiectivele de contrast de fază (cu indicaţia **Ph** cu roşu), în locul celor obişnuite;

✓ se introduce microscopul ocular (notat **Ph** cu roşu) într-unul din tuburile oculare;

✓ se aduce în axa optică a microscopului obiectivul 10x, sau cel ales pentru lucru, apoi se roteşte tamburul condensatorului până când cifra de pe acesta, corespunzătoare aperturii sale, coincide cu apertura obiectivului folosit;

BCU MS CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

✓ se priveşte prin pupila de ieşire a ocularului şi se reglează microscopul ocular (prin apropierea sau îndepărtarea lentilelor din componenţa lui), până când în câmpul vizual apar clar conturate două inele (al diafragmei condensatorului şi al inelului de fază);

✓ cu ajutorul a două cheiţe se rotesc şuruburile de reglare a condensatorului până când inelul din diafragma condensatorului se suprapune peste inelul din obiectiv. Reglarea se face pentru fiecare obiectiv utilizat,

✓ se înlocuieşte microscopul ocular cu ocularul obişnuit.

Observarea preparatelor

✓ se sacrifică un şobolan, se face disecţia abdomenului şi se recoltează fragmente de ficat pe o sticlă de ceas sau o cutie Petri,menţinută pe gheaţă;

✓ se realizează amprente de ţesut hepatic prin apăsarea fragmentelor de ficat pe o lamă de sticlă port-obiect, iar peste amprente se pun imediat 2-3 picături de soluţie fiziologică Krebs-Ringer sau Tyrode (pentru mamifere) ori mediu de cultură. Se acoperă cu o lamelă şi apoi se aşează preparatul pe platina microscopului;

✓ se pune la punct imaginea, conform tehnicii descrise şi se examinează preparatul citologic. Se observă celulele hepatice cu doi nuclei şi structuri membranare intracelulare sub formă de reţea, saculi, granule ovale şi alungite etc.

Aplicaţii practice

- Microscopia în contrast de fază permite studiul celulelor în stare vie, nefixate şi necolorate.
- De asemenea, aceasta scoate în evidenţă detalii de structură care nu se pot observa la microscopul fotonic obişnuit, ca structura nucleului, distribuţia organitelor în citoplasmă, procese în dinamică, precum endocitoza, mişcările citoplasmei, mişcarea cililor şi flagelilor, dinamica cromozomilor, benzile acestora

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

etc.

- Microscopia în contrast de fază permite, de asemenea, studiul reacţiilor celulare faţă de diferiţi agenţi fizici şi chimici şi face posibilă filmarea diferitelor procese celulare, prin cuplarea microscopului cu un aparat de microfilmare.

1.1.4. Microscopia cu interferenţă

Din microscopia cu contrast de fază au derivat:

- **Microscopia cu interferenţă** - care permite aprecierea cantitativă a masei unor componente celulare.
- **Microscopia cu interferenţă diferenţială** - are permite studiul proprietăţilor suprafeţei celulare şi a altor structuri biologice.

1.1.4.1. Microscopul cu contrast de interferenţă

Acest tip de microscop este o variantă a microscopului cu contrast de fază. La microscopul cu contrast de interferenţă, raza de lumină de la sursă este divizată în două raze separate: *raza obiect* (de la preparat) şi *raza de referinţă*. Raza obiect traversează proba şi apoi este întârziată faţă de raza de referinţă care nu atinge proba. Când cele două raze se reîntâlnesc, cu ajutorul unor prisme, diferenţa de fază dintre aceste raze determină o imagine în relief a probei, cu un contrast puternic şi o bună claritate.

1.1.4.2. Microscopul de interferenţă diferenţială Nomarski

Acest tip de microscop este o variantă a microscopului cu contrast de interferenţă. El este un microscop fotonic bazat pe **contrastul de interferenţă**

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

diferenţială (DIC) sau interferenţa Normarski, denumită astfel după numele autorului, care a descris acest principiu de microscopie de interferenţă, în 1952.

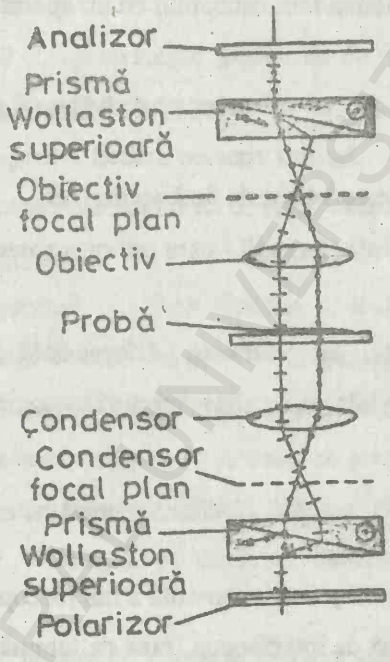


Fig. 4. Microscopul cu contrast de interferenţă diferenţială Nomarski (după Lim, 1998)

Un astfel de microscop (DIC) realizează o separare completă a fasciculului luminos direct şi refractat, determinând formarea unei imagini aparent tridimensionale. Astfel, acest microscop foloseşte două raze rezultate dintr-o sursă de lumină polarizată, fiecare din cele două raze trecând printr-o parte diferită a probei (**Fig. 4**). Diferenţa dintre indicele de refracţie al părţilor probei modifică relaţia dintre cele două raze, astfel încât la recombinarea lor se produce o imagine

de interferenţă cu o mare claritate. Contrastul imaginii este asigurat de o scădere continuă, discretă, a indicelui de refracţie dintre diferite structuri ale preparatului.

Prin variaţia relativ mare, pe distanţă scurtă, a indicelui de refracţie se realizează un contrast pronunţat al diferitelor zone ale imaginii.

1.1.5. Microscopia cu fond întunecat (ultramicroscopia)

Acest tip de microscopie optică se bazează pe fenomenul Tyndall, care constă în dispersia (împrăştierea) luminii de către particulele foarte mici, care se află în suspensie şi care devin vizibile dacă sunt privite pe o direcţie perpendiculară faţa de direcţia razelor luminoase (asemenea particulelor de praf ce se află într-o rază de lumină, sau particulelor coloidale care difuzează lumina în toate direcţiile)

Proba studiată este iluminată cu raze oblice (tangenţiale) printr-un condensator special, cu imersie sau cu oglinzi, iar în obiectiv nu pătrund decât razele care sunt dispersate de particulele aflate în suspensie. În câmpul microscopului apar astfel nişte puncte strălucitoare pe fond negru, ce corespund particulelor cu un diametru de până la 0,003μm, adică de aproximativ 1000 de ori mai mici decât limita de rezoluţie a microscopului optic obişnuit, **microscopul cu fond întunecat** fiind numit, de aceea, **ultramicroscop**. Se pot observa astfel diferite particule din citoplasma celulelor vii, care nu pot fi văzute la microscopul obişnuit, dar nu se pot studia detalii de structură, ci numai forma şi mişcările particulelor.

Microscopul cu fond întunecat permite, de asemenea, studierea unor organisme unicelulare, cum sunt protozoarele şi microorganismele, ale căror structuri apar mult mai clar pe un fond întunecat, comparativ cu imaginea lor la microscopul obişnuit. Aceasta permite, de exemplu, stabilirea mai precisă a diagnosticului unor boli (sifilisul, cauzat de spirochete, sau leptospiroza), ori a

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

particularităţilor fazelor ciclului celular la drojdii (faze ale înmulţirii sexuate sau asexuate).

Aparatura utilizată în ultramicroscopie (Fig.5) cuprinde: un microscop optic mijlociu sau puternic, o sursă de lumină puternică şi un condensator special de ultramicroscopie.

a. Condensorul (condensatorul) pentru ultramicroscopie (inventat de Siedentopf şi Szigmondy) este construit în aşa fel încât reflectă lumina primită de la sursă determinând iluminarea tangenţială a obiectului studiat.

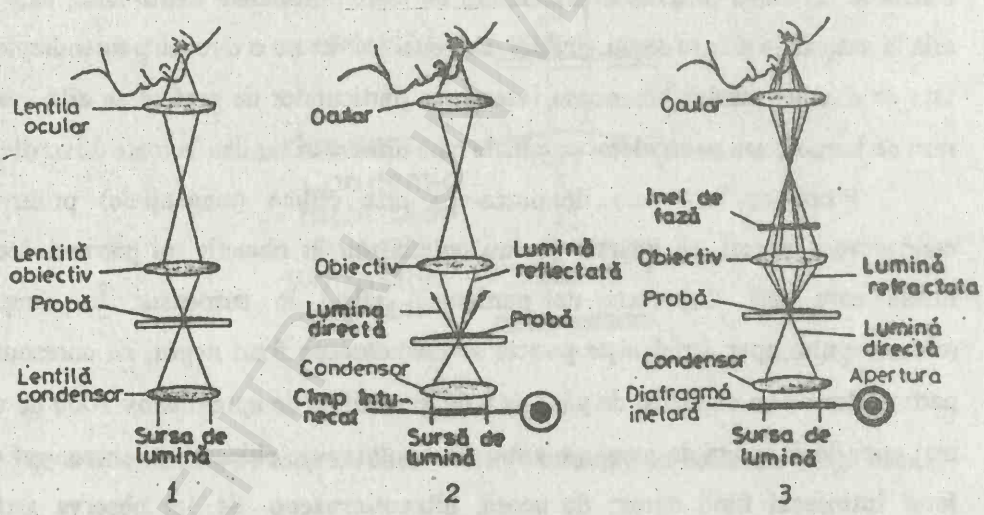


Fig. 5. Microscopul optic cu câmp luminos (1), cu câmp întunecat (2) şi cu contrast de fază (3) (după Lim, 1998)

Există două tipuri de astfel de condensatoare:

Condensatorul cu imersie foloseşte lichid de imersie între condensator şi preparat şi se utilizează în combinaţie cu obiectivele cu imersie. Există două tipuri:

- *Condensatorul cardioid* – are o apertură mare şi un obturator circular care lasă să treacă în condensator numai razele marginale. Astfel se formează un con de

umbră mai mare decât apertura, încât lumina de la sursă nu intră în obiectiv. Razele marginale se încrucişează în preparat şi-l iluminează tangenţial, punându-l în evidenţă, prin fenomenul Tyndall.

- *Condensatorul paraboloid* – are un corp de sticlă ce prezintă o suprafaţă reflectantă parabolică. Are, de asemenea, un obturator care permite intrarea în condensator numai a razelelor marginale, care sunt astfel reflectate încât sunt focalizate pe o suprafaţă mică din planul obiectivului.

La ambele tipuri de condensatoare cu imersie se produce o dublă reflexie a luminii cu ajutorul unei oglinzi mobile, razele reflectate unindu-se pe preparat, într-un singur punct.

Condensatorul cu oglinzi se utilizează în combinaţie cu obiectivele uscate. Razele luminoase care intră în condensator sunt reflectate de nişte oglinzi astfel ca ele să se intersecteze pe preparat. Prezintă de asemenea un obturator central al cărui con de umbră acoperă obiectivul.

b. Sursa de lumină. Pentru ultramiscroscopie se utilizează surse de lumină puternice: lămpi de incandescenţă cu colector, lămpi cu vapori de mercur sau arc voltaic (sunt necesari ochelari de protecţie contra razelor UV).

Modul de lucru

✓ se utilizează un microscop optic obişnuit (de ex. ML4, MC1, MC5, Zeiss, Amplival etc.) la care se montează condensatorul pentru fond întunecat în locul condensatorului Abbé. Condensatorul pentru imersie (cardioid sau paraboloid) se ridică până la nivelul platinei, de la care se scoate inelul din jurul orificiului din dreptul obiectivului;

✓ se aprinde lumina, apoi se pune o picătură de ulei de cedru pe suprafaţa condensatorului, se pune preparatul pe platină şi se face contactul picăturii de ulei

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

cu condensatorul şi lama preparatului, astfel ca să nu existe bule de aer în ulei. Preparatele sunt realizate între lamă şi lamele subţiri;

✓ se centrează lumina şi cu un obiectiv uscat se pune la punct imaginea. Apoi se pune o picătură de ulei de cedru pe lamelă şi se înlocuieşte obiectivul uscat cu obiectivul cu imersie;

✓ se centrează bine condensatorul, rotindu-se oglinda lui cu ajutorul unei pârghii, până când se observă un câmp întunecat pe care apar structuri strălucitoare.

Recomandări

✓ utilizarea de obiective cu imersie (60x sau 90x) cu diafragmă pentru reglarea aperturii;

✓ pentru obţinerea câmpului întunecat este necesară închiderea diafragmei, astfel încât să nu pătrundă lumină în obiectiv (apertura obiectivelor fiind mai mare ca cea a condensatorului cu imersie);

✓ utilizarea condensatorului cu oglinzi impune folosirea de obiective uscate, cu putere de mărire mai mică.

Câmpul întunecat se obţine prin deplasarea condensatorului cu oglinzi pe verticală. Punerea la punct a imaginii permite observarea preparatului pe fondul întunecat.

1.1.6. Microscopia în lumină polarizată

Această tehnică permite studierea unor structuri anizotrope cu ajutorul luminii polarizate, a cărei viteză de propagare diferă în funcţie de direcţia de propagare. Mediile care manifestă această proprietate se numesc *birefringente*.

Există mai multe tipuri de birefringenţă:

a. birefringenţă pozitivă sau negativă:

BCU INGINERIE UNIVERSITY LIBRARY

- pozitivă – când indicele de refracţie are o valoare mai mare în direcţia longitudinală decât în plan perpendicular (la structurile fibrilare, ca fibrele musculare striate, fibrele de colagen, mielina);
- negativă – în cazul când indicele de refracţie este mai mare în planul transversal decât în cel longitudinal (la fibrilele nucleoproteice).

b. birefringenţa cristalină sau intrinsecă – se manifestă în sistemele sau moleculele în care ionii au un aranjament asimetric regulat şi nu depinde de indicele de refracţie al mediului de montare a preparatului (la structurile constituite din proteine sau lipide);

c. birefringenţă de formă sau structură – se manifestă în cazul structurilor în care particulele submicroscopice sunt orientate regulat, într-un mediu cu indice de refracţie diferit;

d. birefringenţa de tensiune – se constată la structurile izotrope care sunt supuse acţiunii unor forţe mecanice. Se manifestă în cazul muşchilor şi al ţesuturilor embrionare;

e. dicroismul – se observă în cazul când absorbţia unei anumite lungimi de undă de lumină polarizată variază în funcţie de orientarea obiectului studiat, datorită diferenţelor de intensitate sau amplitudine a luminii transmise de obiect. Dicroismul poate fi indus în unele structuri biologice de către anumiţi coloranţi, ca roşul de Congo sau thionina, datorită orientării preferenţiale a moleculelor într-o anumită direcţie.

Microscopul cu lumină polarizată

Este un tip de microscop optic care are în structura sa două dispozitive speciale, constituite dintr-o peliculă de film polaroid sau din prisme Nicol de calcită, numite **polarizor şi analizor**, cu planuri de polarizare a luminii care diferă

între ele (**Fig.6**). Polarizorul este aranjat sub condensatorul microscopului, iar analizorul se află deasupra obiectivului.

In cazul când planul de polarizare al analizorului este perpendicular pe cel al polarizorului, lumina nu este transmisă spre ocular. Dacă în drumul razelor de lumină se pune însă un preparat birefringent (pe platina microscopului), planul de polarizare este deviat, datorită întârzierii determinate de întreruperea provocată de preparat. Proba de examinat se roteşte uşor, până când în câmpul microscopului apar puncte de luminozitate maximă şi minimă, caracteristice imaginii obiectului.

Tehnica de lucru

- ✓ se fixează analizorul la diviziunea zero;
- ✓ pentru observarea unui preparat se coboară mai întâi tubul microscopului, apropiind obiectivul de condensator şi se roteşte polarizorul până când se obţine o iluminare maximă şi uniformă a câmpului microscopului;
- ✓ privind prin ocular se roteşte polarizorul la 90^0, perpendicular pe planul polarizorului, până când se obţine întunecarea maximă a câmpului;
- ✓ se aşează pe platina microscopului o lamă port-obiect pe care sunt lipite secţiuni de ficat, rinichi sau intestin, colorate după *metoda topo-optică Romanyi şi colab.* (1978);
- ✓ se pune la punct imaginea conform procedeului folosit la microscopul optic obişnuit şi se studiază preparatul observându-se structurile anizotrope. Aceste structuri pot fi evidenţiate prin rotirea analizorului, până când apar în câmpul microscopului şi se citeşte pe analizor unghiul de rotaţie specific fiecărei structuri.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

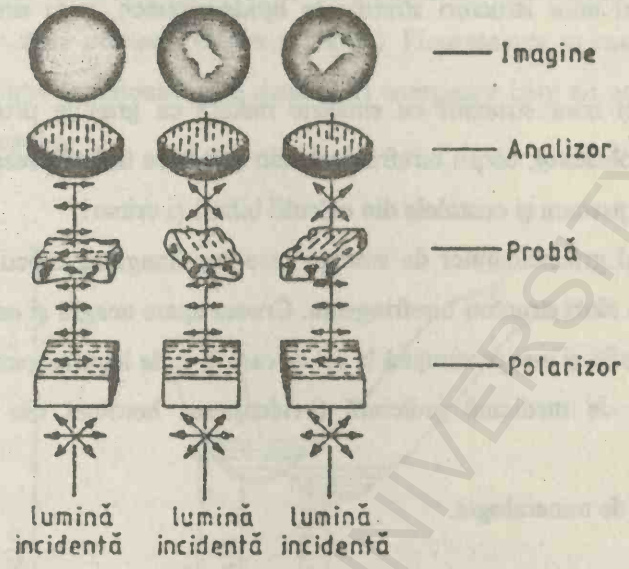


Fig. 6. Microscopul cu lumină polarizată - schema optică a variaţiilor luminoase de maxim şi minim ale unui obiect anizotopic (după Cotrutz şi colab., 1994)

Obţinerea preparatului şi coloraţia Romanyi şi colab.

✓ se fixează materialul biologic în formol şi apoi se secţionează la microtomul de congelare;

✓ secţiunile se colorează cu o soluţie de albastru de toluidină la pH = 4,5;

✓ post-fixare cu fericianură de potasiu, care are proprietatea de a se lega la lipidele şi glicoproteinele din structura biomembranelor, punându-le astfel în evidenţă în lumină polarizată.

Aplicaţii practice:

✓ studiul structurilor care au o compoziţie chimică macromoleculară cu aspect liniar, cum sunt fibrele de colagen, fibrele musculare striate, mielina (cu birefringenţă pozitivă) sau fibrele nucleoproteice (cu birefringenţă negativă);

BCU "IULIU HAŢIEGANU" UNIVERSITY LIBRARY

✓ studiul unor structuri stratificate lipido-proteice, cum sunt membranele biologice;

✓ studiul unor structuri cu simetrie radiară ca granule proteice, structuri lipidice sau colesterol, corpii birefringenţi din urină (ce indică prezenţa grăsimilor saponificate), precum şi cristalele din calculii biliari şi urinari;

✓ studiul grăuncioarelor de amidon care dau imaginea crucii cavalerilor de Malta, ca şi al altor structuri birefringente. Crucea apare neagră şi este mai slabă la amidonul de grâu şi mai pronunţată la cel de cartofi şi de leguminoase;

✓ studii de medicină judiciară (evidenţierea heroinei din sângele celor drogaţi);

✓ studii de mineralogie.

1.1.7. Microscopia cu fluorescenţă

Mecanismul fluorescenţei

Prin absorbţie de energie luminoasă de la o sursă exterioară, moleculele trec din starea lor fundamentală în stare de excitare (Fig.7). Revenirea moleculelor la starea lor fundamentală este însoţită de o emisie de radiaţie luminoasă ce are o energie inferioară radiaţiei absorbite, adică lumina emisă are o lungime de undă mai mare şi o frecvenţă mai joasă decât lumina de excitare, având deci o culoare diferită.

Procesul de emisie a luminii de către anumite molecule excitate se numeşte **luminescenţă**, care se manifestă prin două procese fizice: **fluorescenţă** şi **fosforescenţă**.

Fluorescenţa – se caracterizează prin emisie de radiaţie ce are o energie inferioară radiaţiei absorbite, având deci o lungime de undă mai mare. Revenirea la starea fundamentală (relaxarea), indiferent dacă este sau nu însoţită de emisie

luminoasă, este puternic influențată de numărul electronilor nepereche ai moleculelor în stare excitată (singlet și triplet). Fluorescența se caracterizează prin emisie de radiație luminoasă între două stări energetice care au același număr de electroni nepereche.

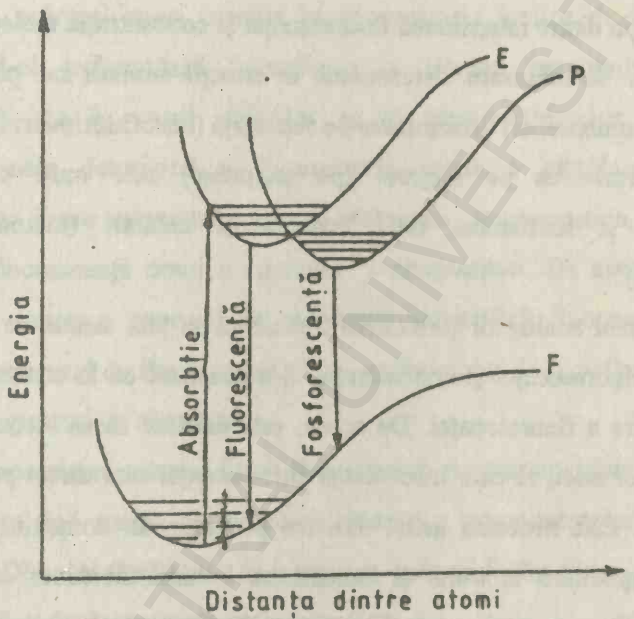


Fig. 7. Curbe de potențial energetic ale unei molecule cu nivele energetice diferite: F - stare energetică fundamentală, E - stare excitată, P - stare excitată a moleculei cu conversie internă și modificare de multiplicitate (după Meșter și Scripcariu, 1976)

Fosforescența – reprezintă emisia de radiație luminoasă a moleculelor excitate, condiționată de trecerea lor din starea de triplet în starea de singlet. Această rearanjare electronică are drept consecință încetinirea fenomenului de emisie prin fosforescență. La întreruperea sursei de iluminare, intensitatea fluorescenței moleculelor începe să scadă. Timpul de înjumătățire la emisia

BCU MEDICINA UNIVERSITY LIBRARY

fosforescentă este cuprins între 10^{-3} secunde şi câteva minute, iar la cea fluorescentă acesta este mult mai scurt : 10^{-9} - 10^{-4} secunde.

Relaţia dintre fluorescenţă şi concentraţie

Pentru ca o moleculă să emită lumină fluorescentă, aceasta trebuie să absoarbă lumină conform cu *legea Lambert – Beer*.

Relaţia dintre intensitatea fluorescenţei şi concentraţia moleculelor depinde de procedeele de măsurare: determinare în direcţia luminii sau perpendicular pe direcţia de iluminare, ori determinare pe suprafaţă (histofluorimetrie).

Determinarea pe secţiuni (pe suprafeţe) este mult utilizată pentru evidenţierea şi localizarea unor constituenţi celulari (metode citospectro-fluorimetrice).

In cazul analizelor cantitative trebuie să se ţină seama de raportul dintre intensitatea fluorescenţei şi concentraţie. S-a constatat că la concentraţii mari are loc o reducere a fluorescenţei. De aceea, este necesar să se lucreze în domeniul concentraţiilor mici, la care intensitatea fluorescenţei este direct proporţională cu concentraţia. Este necesară astfel diluarea probelor. In domeniul concentraţiilor mici, când grosimea stratului şi intensitatea luminii incidente sunt constante, intensitatea fluorescenţei creşte cu concentraţia, având loc un fenomen de "stingere" a fluorescenţei.

Relaţia dintre fluorescenţă şi structura chimică

S-a constatat existenţa unei relaţii evidente între structura chimică a moleculelor şi fluorescenţă.

Teoretic, toate moleculele care absorb lumină ar trebui să prezinte fluorescenţă, dar la multe substanţe aceasta nu se observă, fie datorită unor mecanisme concurente de transport al energiei electronului excitat, fie datorită procesului de "stingere". Stingerea fluorescenţei poate fi determinată de:

BCU "CAROL I" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

modificarea spinului electronilor, modificarea stării de excitaţie a electronilor singlet care determină desfacerea legăturilor chimice etc.

Unele structuri chimice au însă o mare capacitate de a emite în fluorescenţă. Fenomenul de fluorescenţă este puternic influenţat de natura solventului folosit. Pentru studiile biologice, sunt de mare interes substanţele ionizate în solvenţi apoşi precum şi concentraţia ionilor de hidrogen (pH-ul). Astfel, pH-ul influenţează intensitatea şi poziţia maximului spectrului de fluorescenţă, ca în cazul indolilor şi al aminoacridinelor. La pH neutru, aminoacridinele determină o fluorescenţă verde a citoplasmei, ce reflectă interacţiunea dintre colorantul neutru şi proteinele citoplasmatice, iar la pH acid ele produc o fluorescenţă oranj a nucleilor şi citoplasmei. De asemenea, disocierea urmată de creşterea energiei de rezonanţă intensifică fluorescenţa. Acizii tari deplasează spectrul de fluorescenţă al 5 – oxiindolului de la 330nm la 540nm, fără a influenţa spectrul de absorbţie.

În aprecierea relaţiei dintre fluorescenţă şi structura chimică a moleculelor trebuie să se ţină seama de structura chimică a componentelor celulare. Astfel, structura ADN-ului (legăturile de hidrogen, anionii fosfat liberi, aspectele sterice) influenţează mult fluorescenţa aminoacridinei.

Există o serie de grupări sau structuri fluorofore, care, dacă sunt introduse în moleculă, participă la emisia fluorescentă. Unele dintre acestea intră în constituţia unor molecule deosebit de importante pentru funcţiile celulare. Astfel de substanţe sunt:

- *grupa fenolilor*: estrogenii, tocoferolul, piridoxina şi analogii ei, tirozina, adrenalina etc.;
- *grupa aminelor aromatice*;

BCU "CAROL I" UNIVERSITY LIBRARY

- *grupa compuşilor policiclici:* hidrocarburile cancerigene, indolii, purinele, nucleotidele, riboflavinele, o serie de coloranţi etc.

Fluorescenţa naturală şi indusă

Există două ctegorii de fluorescenţă, în funcţie de natura substanţelor fluorescente:

a. Fluorescenţa primară (naturală sau autofluorescenţa) este produsă de substanţe care, la o iluminare în ultraviolet, emit în mod natural radiaţii cu o lungime de undă mai mare (*legea Stoke*), adică în domeniul vizibil. Astfel de substanţe se găsesc în mod natural în celule şi ţesuturi: vitamina A (fluorescenţă verde), vitamina B_2 (fluorescenţă albăstruie), derivaţi de oxidare ai lipidelor (fluorescenţă galben-brună), porfirinele (fluorescenţă roşie), proteinele (fluorescenţă albă determinată de aminoacizii aromatici - tirozina, triptofanul), lipofuscina, cromolipidele, adrenalina, noradrenalina.

b. Fluorescenţa secundară (indusă) este provocată prin tratarea structurilor biologice (secţiuni de ţesuturi) cu substanţe colorante capabile de emisie fluorescentă (fluorocromi), sau cu substanţe care facilitează formarea unor grupări fluorocrome. Astfel, tratamentul cu acid sulfuric concentrat determină fluorescenţa testosteronului, criofosfina O provoacă fluorescenţa ADN (în verde) şi a ARN-ului (în roşu). Prin această metodă se mai pot detecta şi fibrele de colagen, de reticulină şi cele elastice, mucinele etc.

Utilizarea fluorimetriei în biologia celulară

Metodele fluorimetrice prezintă o serie de avantaje faţă de alte metode, fiind foarte utile în studii de biologie celulară şi histochimie cantitativă, pe celule vii şi pe celule fixate, aceste metode având o mare sensibilitate şi selectivitate faţă de anumite componente celulare.

Astfel, o serie de substanţe cu grupări fluorofore specifice se utilizează pentru evidenţierea anumitor structuri celulare: *acridin-orange*, *criofosfina O* şi *sulfat de berberiu* – pentru acizi nucleici, *auroflavina* pentru mucus, *geramina* pentru mielină (fluorescenţă roşie), *galben de thiazol* (sau de titan) pentru colagen (fluorescenţă galbenă) şi pentru celula musculară (fluorescenţă albastră) etc.

Tehnicile de microfluorimetrie şi microspectrofluorimetrie prezintă o sensibilitate deosebită pentru detectarea unor cantităţi foarte mici de molecule fluorescente. Astfel, se pot aprecia volume foarte mici, ca de exemplu: 10^{-12} litri, corespunzător volumului unei celule mari sau 10^{-14} litri, corespunzător volumului unei mitocondrii.

In tehnicile de microspectrofluorimetrie se utilizează o mare varietate de aparate, dintre care unele sunt foarte complexe: microscopul fotonic cu fluorescenţă, microspectrofluorimetre cu sistem electronic de măsurare a fluxului de fotoni, sisteme de integrare a datelor şi calcul computerizat, microspectrografe, echipament de televiziune şi recording.

Astfel de tehnici permit studiul unor preparate biologice tratate cu coloranţi vitali, pentru observarea lizozomilor ce au acumulat coloranţi fluorescenţi (acridin oranj), pentru studiul cromozomilor (benzi fluorescente, detectarea cromosomului Y), în studii de imunologie (imunofluorescenţă), de histochimie şi citochimie. De asemenea, prin aceste tehnici se pot face studii privind organizarea chimică a elementelor nucleare, tipurile de ADN şi modul lor de legare cu proteinele, localizarea unor gene pe cromosomi, anomalii cromosomiale, mecanismele fundamentale de captare şi acumulare a energiei, dinamica proceselor enzimatice celulare, modificări conformaţionale ale macromoleculelor etc.

Prin tehnicile **imunohistochimice** care utilizează anticorpi specifici marcaţi cu un fluorocrom (izothiocianatul de fluoresceină) pentru hormoni, au fost caracterizaţi unii hormoni adenohipofizari, iar prin examinarea ulterioară a

secţiunilor hipofizare la microscopul fotonic în UV s-au identificat celulele secretorii care produc hormonii hipofizari.

In studiile citoenzimologice, metodele fluorimetrice cantitative şi cele histofluorimetrice au o mare importanţă pentru localizarea intracelulară a unor substanţe şi cunoaşterea unor procese celulare, Determinările cantitative enzimatice prin metode fluorimetrice au la bază o serie de proprietăţi ale coenzimelor (NAD şi FAD). Astfel, formele reduse ale piridinnucleotidelor (NADH şi NADPH), la iluminare cu raze UV, emit lumină fluorescentă, având două benzi de absorbţie maximale la 260nm şi 340nm şi un maximum de emisie în fluorescenţă la 457nm. Fluorescenţa lor este maximă la pH neutru, asemănător pH-ului intracelular, ceea ce a permis elaborarea unor metode directe de determinare a activităţii celular, cu o sensibilitate mai mare decît determinările de absorbţie. Se pot evidenţia astfel concentraţii de NADH şi NADPH cuprinse între 0,1 şi 10μM (10^{-1} - 10^{-9} moli / ml). Sensibilitatea fluorimetrică poate fi crescută prin tratarea cu baze tari, atât a formelor reduse cât şi a celor oxidate ale NAD.

FAD sub formă oxidată (FAD^+) prezintă emisie fluorescentă, în timp ce forma redusă $FADH_2$) nu manifestă fluorescenţă.

Prin astfel de studii asupra acestor piridinnucleotide, s-au realizat investigaţii asupra cineticii enzimatice a unor dehidrogenaze, precum şi asupra metabolismului celular şi al funcţiilor mitocondriale (Teorell; Chance şi colab., cit. Meşter şi Scripcariu, 1976).

Grupările: =CH- , $-OCH_3$, $-CH_3$, -CN intensifică fluorescenţa iar grupările $-COO^-$, $-NO_2$ o reduc.

1.1.7.1. Microscopul cu fluorescenţă

Microscopul de fluorescenţă este un microscop optic obişnuit care este însă dotat cu unele dispozitive speciale (Fig.8).

a. Sursa de lumină este o lampă cu vapori de mercur ce emite radiaţii UV, sau o lampă cu xenon ori vapori de cadmiu. Lămpile cu vapori de mercur, pot fi de tipul HBO50, HBO100 sau HBO200 (tip Zeiss sau Opton). Microscoapele de cercetare româneşti MC1 şi MC5 au instalaţii de fluorescenţă cu lămpi HBO 200 (200 W 3,3 – 3,9A), prevăzute cu sistem de ventilaţie, de reflectare a razelor şi de focalizare reglabilă, precum şi cu un suport pentru filtre. Alimentarea lămpii se face printr-un dispozitiv care generează iniţial (câteva secunde) un curent de înaltă tensiune ce vaporizează mercurul din tub. Lampa, odată aprinsă, nu poate fi stinsă imediat, ci numai după 30 min. de funcţionare, iar odată stinsă, poate fi reaprinsă numai după o pauză de 20 - 40 min. (altfel se arde – implozie).

b. Condensatorul, obiectivul şi lama cu preparatul microscopic sunt din cuarţ, deoarece sticla obişnuită absoarbe razele UV.

Condensatorii utilizaţi în microscopia fluorescentă sunt de trei tipuri: *condensator UV* cu apertura numerică de 1,20, *condensator pentru câmp întunecat* şi *condensator cu oglindă*, care se montează în locul condensatorului obişnuit. La utilizarea condensatorului special pentru fond întunecat, pentru imersia dintre condensator şi lamă se utilizează ulei de imersie sintetic sau glicerină pură nefluorescentă.

Ocularul are o construcţie specială, pentru a proteja ochiul şi a permite observarea fluorescenţei. Zonele fluorescente ale preparatului apar luminoase pe un fond întunecat. Microscopia de fluorescenţă necesită două tipuri de filtre de lumină care opresc radiaţiile vizibile şi calorice:

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- **filtre de excitaţie** – colorate în nuanţe de albastru-violet închis. Ele reţin radiaţiile emise de sursă, în afara celor UV, lăsând să treacă radiaţiile cu lungimea de undă care excită fluorocromul. Se montează în talpa microscopului, între oglindă şi condensator;
- **filtre de baraj (de protecţie)** – protejează retina oprind lumina primară venită de la sursă, lăsând să treacă numai lumina emisă de fluorocrom. Se montează între obiectiv şi ocular.

Filtrele se aleg astfel încât transparenţa lor să fie maximă în domeniul de absorbţie al fluorocromului. Astfel, filtrele de excitaţie şi cele de baraj se aranjează în funcţie de fluorocromul utilizat (**TABEL II**).

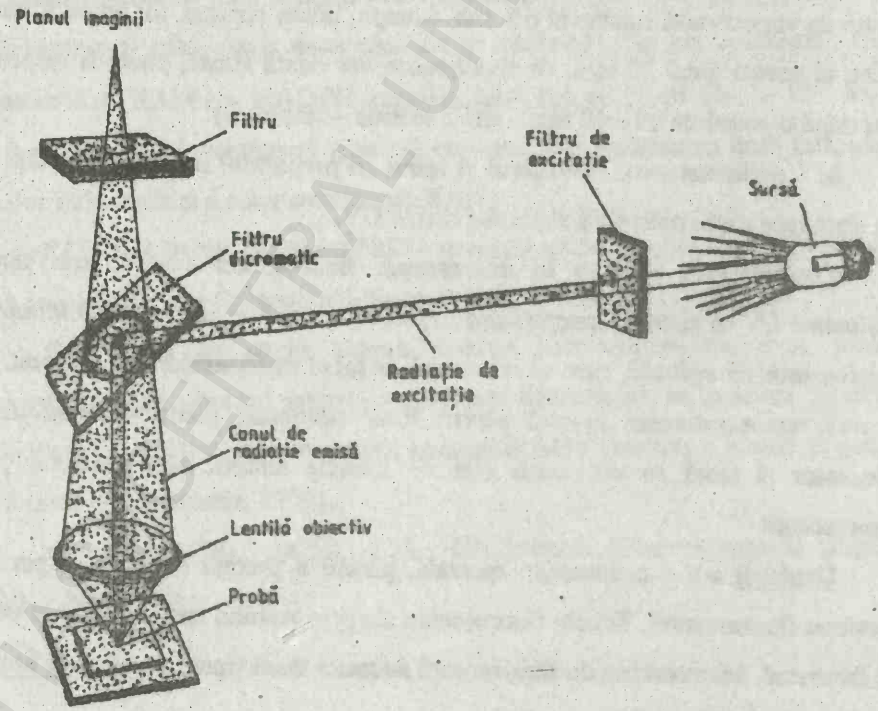


Fig..8. Schema microscopului cu fluorescenţă (după Cotrutz şi colab., 1994)

TABEL II. Combinaţii de filtre pentru microscopia de fluorescenţă (după Meşter şi Scripcariu, 1976)

Fluorocrom	Condensator	Filtre de excitaţie	Filtre de baraj	Indicative şi culoare
Izotiocianat de fluoresceină	Câmp luminos Câmp întunecat	UG 1/1,5 + BG 12/2 UG 1/1,5	GG 9/1 Wratten 2 B între GG 13/3 şi GG 13/1	palid galben-verzui incolor
Acid dietil naftalen-sulfonic	Câmp luminos Câmp întunecat	UG 1/1,5 + BG 12/4 UG 1/1,5	GG 9/1 Wratten 2 B între GG 13/3 şi GG 13/1	palid galben-verzui incolor
Lissamin-Rhodamine B_{200}	Câmp luminos Câmp întunecat	BG 12/5 BG 12/3	GG 9/1+ OG 1/1,5 GG 9/1	galben-portocaliu palid galben-verzui

1.1.7.2. Microscopul cu imunofluorescenţă

Foloseşte ca fluorocrom (colorant fluorescent) fluoroscein izotiocianatul (FITC), care absoarbe lumina albastră şi emite lumină verde. FITC se conjugă cu anticorpii care se leagă cu antigenii specifici de pe preparat, care poate fi astfel studiat.

1.1.7.3. Microscopul cu lumină fluorescentă transmisă

În acest caz, pentru observarea fluorescenţei se foloseşte lumina transmisă la o iluminare combinată cu câmpul întunecat. (Fig. 9a).

Lumina trece printr-un *filtru de excitare*, înainte de a atinge proba. Acest filtru permite numai radiaţiei cu lungime de undă mică să treacă prin proba studiată.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Fluorocromul din probă absoarbe această radiaţie şi emite lumină de lugime mare de undă, care trece la obiectiv şi la *filtrul de protecţie*, ce blochează razele UV, ajungând la ochi numai lumina din spectrul vizibil.

Un condensator de câmp întunecat îndepărtează excesul de lumină din obiectiv, determinând un fond întunecat, pe care se vede imaginea probei, mai slab luminată dar clară.

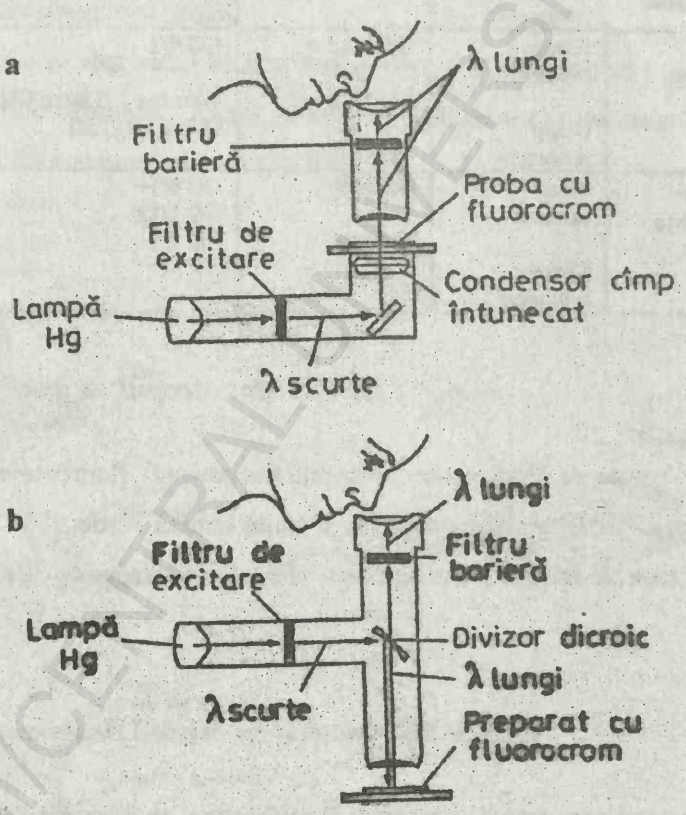


Fig. 9 Microscopul cu lumină fluorescentă transmisă (a) şi cu epifluorescenţă (b) (după Lim, 1998)

BCU IAŞI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

1.1.7.4. Microscopul cu epifluorescenţă (sau cu lumină de excitare incidentă)

Acest tip de microscop, foloseşte lumină cu lungime de undă mică, filtrată, care este direcţionată la un dispozitiv numit *divizor dicroic* (engl. *dichroic splitter*) care o separă în două raze diferite (Fig. 9b). Acest dispozitiv reflectă spre probă razele cu lungime mică de undă şi totodată transmite spre ochi, prin filtrul de protecţie, razele cu lungime mare de undă emise de preparat (epifluorescenţă). Epifluorescenţa creşte sensibilitatea fluorescenţei şi permite preparatului să fie iluminat şi vizualizat cu dispozitive optice normale, iar imaginea obţinută este mult mai clară.

Aplicaţii practice ale microscopiei de fluorescenţă

In afară de aspectele prezentate anterior privind aplicabilitatea microscopiei de fluorescenţă în biologia celulară, se pot face şi alte precizări asupra aplicaţiilor practice.

a. Fluorescenţa primară se utilizează în identificarea următoarelor componente celulare:

- *pigmenţi* : porfirine (fluorescenţă roşie), pigmenţi carotenoizi, lipocromi (fluorescenţă verde), cromolipide (fluorescenţă galben-verde), lipofuscina (fluorescenţă roşie-brună);
- *aminoacizi*: tirozina, fenilalanina, triptofan (fluorescenţă albastră);
- *virusuri şi bacilul Koch* (fluorescenţă verde luminoasă);
- *dinţii naturali* sunt autofluorescenţi, prin aceasta deosebindu-se de cei *artificiali*;
- *aminele biogene* : adrenalina, noradrenalina, serotonina (fluorescenţă verde).

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

b. Fluorescenţa secundară prin fluorocromare cu acridin orange se poate utiliza pentru identificarea unor componenţi celulari:

- *acizi nuleici*: ADN (fluorescenţă verde-galbenă), ARN (fluorescenţă roşie);
- *fibre de colagen*, fibre de reticulină şi fibre elastice (fluorescenţă verde);
- *nucleii leucocitelor* (fluorescenţă verde), citoplasma leucocitelor şi eritrocitele rămân opace;
- *mucinele* (fluorescenţă verde).

De asemenea, fluorescenţa secundară permite *citodiagnosticul precoce al cancerului* (studiul acizilor nucleici în cazul proceselor tumorale) precum şi *localizarea antigenelor în celulă* (prin imunofluorescenţă).

1.1.8. Microscopia în ultraviolet

Microscopia prin fluorescenţă se deosebeşte de microscopia cu raze ultraviolete, care se bazează pe absorbţia luminii UV de către moleculele preparatului.

Microscopia în UV se aseamănă cu spectrofotometria, dar pentru vizualizare utilizează înregistrarea fotografică. Razele UV trec prin lentile speciale şi prin preparat şi, datorită unui fond diferit de absorbţie, dau o imagine invizibilă pentru ochi, dar care se înregistrează fotografic.

Microscopia în UV se utilizează pentru identificarea acizilor nucleici, bazelor purinice şi pirimidinice din nucleotide, a anumitor aminoacizi din proteine.

Se ştie că puterea de rezoluţie a unui microscop depinde de lungimea de undă a radiaţiei care iluminează obiectul şi de apertura numerică a obiectivului:

$$D_o = \frac{0{,}61\lambda}{n \cdot \sin\alpha}$$

BCU IAŞI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Pentru mărirea puterii de rezoluţie se măreşte apertura numeri (AN) sau se scade lungimea de undă. AN este însă o mărime limitată, neputând fi micşorată prea mult şi de aceea se recurge la scăderea lungimii de undă a radiaţiei (raze UV sau flux de electroni). Astfel, s-au construit microscoape fotonice monocromatice care folosesc radiaţia ultravioletă a spectrului, cu o lungime de undă (λ) de 270-360 nm (invizibilă pentru ochiul omului).

Microscopul cu lumină UV este un microscop obişnuit, dar la care ocularele, obiectivele şi condensatorul sunt din cuarţ topit, transparent pentru razele UV, iar sursa de lumină este o lampă cu vapori de mercur HBO50, HBO100 sau HBO200).

Punerea la punct a microscopului se realizează în mod obişnuit (ca şi în lumină albă şi în fluorescenţă), după care în suportul de filtre se aşează un *filtru Wood* care este permeabil numai pentru razele UV şi impermeabil pentru cele din domeniul vizibil.

Imaginea preparatului nu este vizibilă, deoarece acesta este iluminat numai cu raze UV, de aceea imaginea este fotografiată, pelicula fotografică fiind sensibilă la UV. Fotografia imaginii în UV surprinde detalii de structură care nu se pot observa în lumina din domeniul vizibil, microscopul cu raze UV având o putere de rezoluţie de trei ori mai mare (100 – 135nm) decât microscopul optic obişnuit.

Metoda prezintă dezavantajul că toate imaginile trebuie fotografiate pentru a fi studiate. Pentru vizualizarea imaginilor, preparatele se tratează cu substanţe fluorescente, ca în cazul microscopiei în lumină fluorescentă.

În microscopia în UV se lucrează cu ochelari de protecţie.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

1.1.9. Alte tipuri de microscoape optice

1.1.9.1. Stereomicroscopul

Este un microscop binocular sau trinocular destinat studiului tridimensional de ansamblu şi de detaliu al materialului biologic, trierea de material, microdisecţii, cercetări de citologie, biologie celulară, entomologie, ecologie, biofizică (înregistrări de biopotenţiale cu microelectrozi intracelulari).

Are un câmp al obiectivului cu diametru mare (3,5 – 99,5mm), distanţă mare de lucru între obiectiv şi preparat (100 – 350mm), apertură numerică de circa 0,2, ceea ce permite studiul preparatelor de dimensiuni mari şi observarea detaliilor în spaţiu. Poate avea un dispozitiv de focalizare automată, putere de mărire variabilă (2 – 640x), în funcţie de oculare (dintre care unul este reglabil) şi obiectiv, rezoluţie performantă (600 perechi de linii / mm), precum şi dispozitive pentru observare diascopică şi episcopică (lumină transmisă şi reflectată).

La acest microscop se pot efectua observaţii în câmp luminos şi întunecat, contrast de fază, epifluorescenţă, cât şi înregistrări foto şi video. I se pot ataşa şi camere de desenat şi micrometre pentru măsurarea dimensiunilor preparatelor.

1.1.9.2. Microscopul inversat

Este asemănător cu microscopul optic obişnuit dar are revolverul cu obiective dispus invers, sub platină, permiţând accesul lejer la preparat.

Este utilizat pentru studii *in vivo* şi *in vitro* de citologie, biologie celulară, microinjecţii, genetică, culturi de celule, microscopie confocală, biofizică (patch-clamp) etc.

Are dispozitive pentru câmp luminos şi întunecat, contrast de fază, contrast Varel (în relief), contrast de interferenţă diferenţială, epifluorescenţă, foto-TV,

BCU "CENTRALA UNIVERSITARĂ" LIBRARY

cameră foto digitală, sistem video cu imprimată, magnetoscop, scanner, analizor de imagine, platină mobilă şi termoreglabilă, iluminare reglabilă, condensator culisant.

Puterea de mărire are valoare mare, în funcţie de oculare,(dintre care unul este reglabil)şi obiective.

1.1.9.3. Sistemul microscop – fotometru

Este un sistem optico-spectrofotometric ce cuprinde un microscop optic, un fotometru şi un computer, având utilizări multiple în biologie, medicină, geologie, industrie etc.

Prezintă programe (software) specializate pentru analize microscopice, colorimetrice şi spectrale, permiţând investigaţii de transmitanţă, absorbanţă, fluorescenţă şi microscopie optică normală.

1.1.10. Anexele microscopului optic

In afara componentelor de bază, microscopul optic este dotat şi cu numeroase accesorii, care măresc gama utilizărilor sale. Aceste anexe se pot intercala în axul optic, fie la nivelul ocularului sau al obiectivului, fie la platina microscopului, la sursa de lumină sau la condensator.

Cele mai utilizate dispozitive anexe ale microscopului optic sunt:

1.1.10.1. Micrometrul ocular

Micrometrul ocular este o lamă rotundă de sticlă pe care este gravată o scală cu o lungime totală de 1cm, gradată în 100 diviziuni egale, fiecare diviziune având

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

0,1 mm (Fig. 10). Scala gravată poate avea şi forma unui pătrat, cu latura divizată în 20 părţi egale, fiecare pătrăţel având latura de 0,5mm.

Pentru măsurători, micrometrul ocular se aşează la microscop la nivelul diafragmei dintre cele două lentile ale ocularului. El serveşte la măsurarea dimensiunilor din planul orizontal al obiectivului. Valoarea reală (utilă) a unei diviziuni de pe scala micrometrului ocular depinde de puterea de mărire a ocularului şi al obiectivului şi se stabileşte prin etalonare (comparaţie cu scala unui micrometru obiectiv).

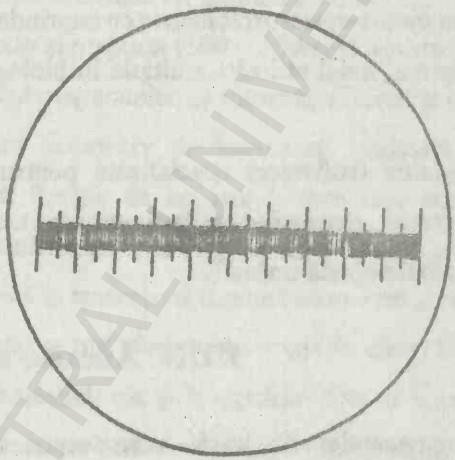


Fig. 10. Micrometrul ocular

1.1.10.2. Micrometrul obiectiv

Este o lamă alungită de sticlă în centrul căreia se află o scală micrometrică de 1mm lungime, gradată în 100 diviziuni egale, fiecare diviziune având astfel 0,01 mm (sau 10μm) (Fig. 11).

BCU "LUCIAN BLAGA" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

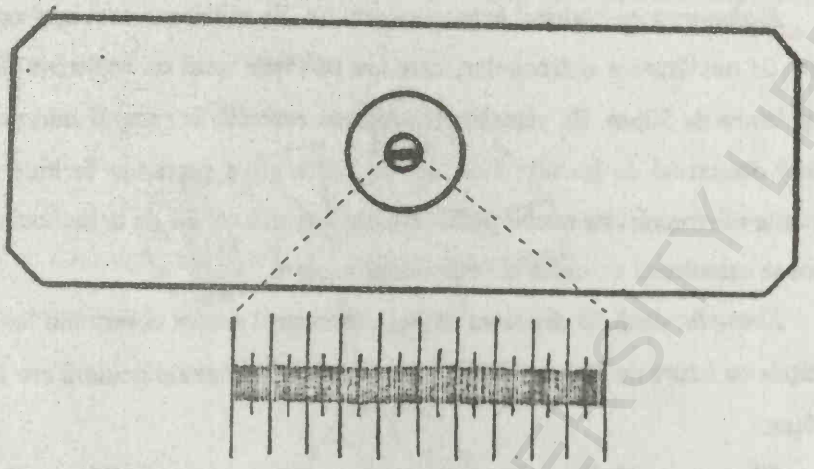


Fig. 11. Micrometrul obiectiv

Etalonarea micrometrului ocular. Stabilirea valorii utile (reale) a unei diviziuni de pe scala micrometrului ocular (etalonarea) se poate realiza pe două căi:

- *Etalonarea cu ajutorul micrometrului obiectiv.* Se introduce micrometrul ocular în ocularul microscopului, pe diafragma de sub prima lentilă. Se aşază micrometrul obiectiv pe platina microscopului şi se vizualizează scala gradată, utilizând obiectivul cu imersie, fără ulei de cedru. Apoi se face etalonarea pentru toate obiectivele (şi ocularele) microscopului. Prin rotirea ocularului, se suprapun în linie dreaptă diviziunile micrometrului ocular peste cele ale micrometrului obiectiv. Cunoscând diviziunea unei diviziuni de pe micrometrul obiectiv (10μm), se determină valoarea unei unei diviziuni de pe scala micrometrului ocular, prin regula de trei simplă, pentru fiecare obiectiv şi ocular de la microscop în parte. Exemplu: dacă 60 diviziuni oculare se suprapun peste 11 diviziuni de la obiectiv (110μm), atunci 1 diviziune de la ocular are: 110 : 60 = 1,83μm.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- *Etalonarea cu ajutorul hemocitometrului*. Se utilizează caroiajul central al camerei de numărare a eritrocitelor, care are pătrățele mici cu suprafața de 1/400 mm^2 și latura de 50μm. Se vizualizează rețeaua caroiată în câmpul microscopului utilizând obiectivul de imersie fără ulei de cedru și se suprapun în linie dreaptă diviziunile micrometrului ocular peste cele ale pătratelor mici de la hemocitometru, iar apoi se calculează valoarea unei diviziuni oculare.

Exemplu: dacă 83 diviziuni de la micrometrul ocular corespund lungimii a 3 pătrățele cu latura de 50μm, adică 150μm, atunci 1 diviziune oculară are 150 : 83 = 1,80μm.

Observație. Etalonarea micrometrului ocular este valabilă numai pentru microscopul, sistemul optic (ocular și obiectiv) și micrometrul folosit la etalonare. Orice schimbare necesită o reetalonare.

1.1.10.3. Ocularul cu șurub micrometric

Acesta este un ocular special, utilizat după etalonare pentru măsurarea dimensiunii (lungimii) unui preparat microscopic. El are o rețea micrometrică în fața căreia se deplasează un indicator, prin manevrarea unui tambur gradat cu 100 diviziuni. O rotație completă a acestui tambur corespunde la 1mm (Fig.12).

Măsurarea se face determinând numărul de rotații complete, plus numărul de diviziuni de pe tambur, necesare pentru ca indicatorul de pe rețeaua micrometrică să fie deplasat de la o extremitate la alta a imaginii. Se face apoi calculul dimensiunii, prin comparare cu indicațiile micrometrului ocular.

BCU IAȘI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

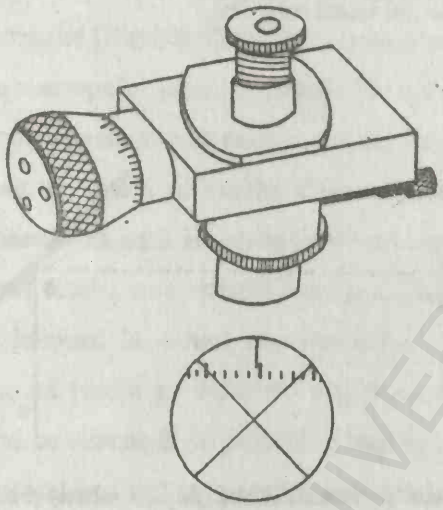


Fig. 12. Ocularul cu şurub micrometric (sus) şi reticulul cu gradaţii şi indicator (jos) (după Ambruş şi colab., 1971)

1.1.10.4. Aparate de desenat

Imaginile microscopice se pot înregistra prin fotografiere sau prin desenarea lor. Desenul poate reda întreg câmpul microscopului, în timp ce microfotografia redă clar numai un singur plan al obiectului studiat. Desenarea imaginii microscopice necesită aparate speciale de desenat, dintre care cele mai utilizate sunt: **aparatul Abbé şi camera clară.**

a. Aparatul Abbé. Acest aparat este alcătuit dintr-un sistem de două prisme dreptunghiulare, lipite între ele prin ipotenuze şi o oglindă (**Fig.13**). Cele două prisme formează un cub care se montează peste ocularul microscopului. Prisma superioară are ipotenuza argintată, cu excepţia unui cerc median, cu diametrul de 2mm. Acesta formează un orificiu circular, prin care fasciculul de

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

lumină din microscop (x y) ajunge la ochiul observatorului, orificiul fiind situat în prelungirea axului ocularului microscopului.

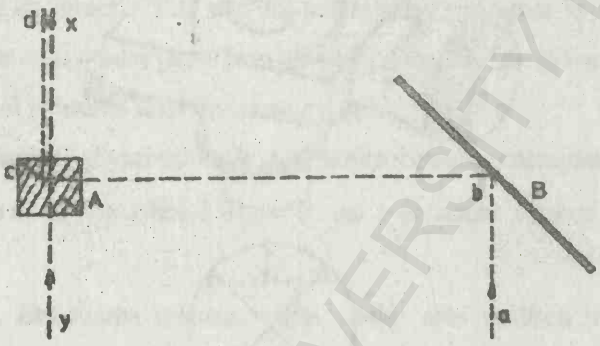


Fig. 13. Aparatul de desenat Abbé (după Ambruş şi colab., 1971)

Cubul de prisme este prins într-o montură metalică în care se află un orificiu (A) în dreptul catetei opuse feţei argintate a prismei superioare. Perpendicular pe acest orificiu şi tangent faţă de el se află un braţ metalic cu lungime reglabilă, fixat în montura prismei. La capătul acestui braţ există o oglindă plană (B) cu înclinare reglabilă, paralelă cu faţa argintată a prismei. Acest montaj permite suprapunerea imaginii studiate la microscop peste imaginea unei coli de hârtie, cele două imagini apărând suprapuse în ochiul observatorului.

Pe masa de lucru, exact sub oglindă, se pune o coală de hârtie pe care se va executa desenul şi care trebuie să fie bine luminată. Razele de lumină (ab) care vin de la hârtie sunt reflectate de oglindă spre faţa argintată a prismei, de unde vor fi reflectate spre ochiul observatorului (d). Astfel, observatorul vede simultan imaginea obiectului examinat, imaginea hârtiei şi imaginea vârfului creionului, cu care poate trasa conturul structurilor observate. Lungimea braţului oglinzii se poate regla în funcţie de mărimea preparatului.

BCU "ALEXANDRU IOAN CUZA" UNIVERSITY LIBRARY

b. Camera clară. Este un aparat de desenat care se fixează deasupra ocularului microscopului (Fig.14). Camera are o montură metalică şi un manşon de fixare la tubul microscopului printr-un şurub. Ea prezintă trei orificii circulare, dintre care două sunt situate pe axa microscopului, iar al treilea pe faţa inferioară. In camera clară sunt montate două prisme. Fasciculul de lumină reflectat de fila de hârtie pe care se desenează intră în camera clară prin orificiul inferior şi întâlneşte o prismă cu reflexie totală, care reflectă lumina cu 90^0 spre a doua prismă, care trimite fasciculul luminos la ochiul observatorului. A doua prismă este astfel montată, încât acoperă numai jumătate din ieşirea ocularului, ceea ce permite ca fasciculul de lumină ce vine de la preparat să ajungă prin acelaşi orificiu al camerei la ochiul observatorului. Astfel, imaginea obiectului şi imaginea hârtiei se suprapun, aceasta permiţând realizarea desenului după procedeul descris la aparatul cu oglindă. Şi în acest caz este necesară o bună reglare a poziţiei camerei şi a iluminării preparatului şi a desenului. Camera clară se utilizează si pentru determinarea puterii de mărire a microscopului şi a dimensiunii structurilor studiate.

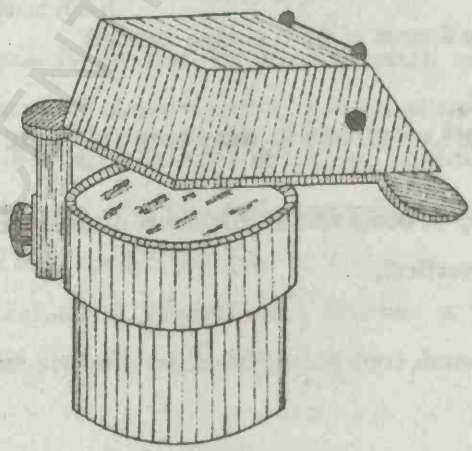


Fig. 14. Camera clară (după Ambruş şi colab., 1971)

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

c. Ocularul de desenat. Este un dispozitiv alcătuit dintr-un ocular microscopic obişnuit şi o cameră clară (**Fig.15**). În ocular se află o prismă romboidală (R) care acoperă jumătate din ieşirea ocularului. Pe faţa inferioară a acestei prisme se află o deschidere prin care intră în ocular razele de lumină care vin de la hârtia pe care se execută desenul. Toate indicaţiile de utilizare a camerei clare sunt valabile şi pentru acest dispozitiv.

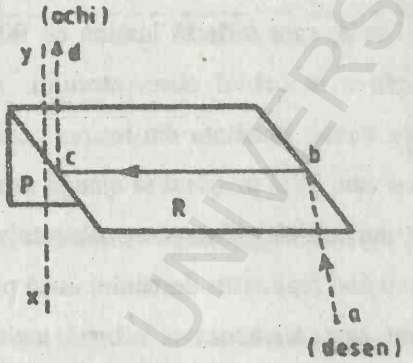


Fig. 15. Principiul ocularului de desenat: xy - axa optică a microscopului; P - prisma cu reflexie totală; a,b,c,d - drumul razelor de la desen la ochi; R - prismă romboidală (după Ambruş şi col., 1971).

Pentru a nu se deforma imaginea, este necesar ca microscopul la care se montează ocularul de desenat să fie în poziţie verticală.

1.1.11. Masurători efectuate la microscopul optic

La microscop se poate realiza măsurarea dimensiunilor obiectelor în **plan orizontal şi în plan vertical.**

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

1.1.11.1. Măsurători în plan orizontal

Pentru măsurarea dimensiunilor aflate în plan orizontal, se utilizează mai multe metode:

a. Metoda micrometrului ocular şi obiectiv. In afară de procedeul descris (etalonarea micrometrului ocular), există şi un procedeu general de realizare a etalonării micrometrului ocular urmat de determinarea mărimii obiectului studiat. Pentru aceasta, se introduce în ocular micrometrul ocular şi se pune micrometrul obiectiv pe platina microscopului. Se clarifică apoi imaginea micrometrului obiectiv, cu ocularele şi obiectivele care se vor utiliza. Operaţia se face pentru fiecare ocular şi obiectiv în parte.

In continuare se determină numărul de diviziuni ale micrometrului ocular care corespund unei diviziuni de pe micrometrul obiectiv. Dacă nu se găseşte un număr exact de diviziuni, se caută un număr de diviziuni ale micrometrului ocular care se suprapun exact peste un număr determinat de diviziuni ale micrometrului obiectiv. Cifra găsită se împarte la numărul diviziunilor de pe micrometrul obiectiv, stabilindu-se astfel valoarea unei diviziuni a micrometrului ocular sau *coeficientul micrometric* (Cm).

Exemplu: dacă 19 diviziuni de pe micrometrul ocular corespund la 4 diviziuni de pe micrometrul obiectiv, atunci, o diviziune a micrometrului obiectiv corespunde la 19 : 4 = 4,75 diviziuni de pe micrometrul ocular. Deoarece o diviziune de la micrometrul obiectiv are 0,01 mm (10μm), 4,75 diviziuni ale ale micrometrului ocular vor avea deci 0,01mm.

De aici se calculează valoarea unei diviziuni a micrometrului ocular (coeficientul micrometric al micrometrului ocular) după formula:

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

$$Cm = 0{,}01 : 4{,}75 \text{ sau } Cm = 10/475$$

Se îndepărtează micrometrul obiectiv, se examinează preparatul biologic şi se determină dimensiunile lui în plan orizontal (lungime, grosime, diametru), în număr de diviziuni ale micrometrului ocular.

Mărimea obiectului (M) va fi:

$$M = \frac{10}{475} \times N \text{ sau } M = Cm \times N \text{ unde:}$$

- Cm = coeficientul micrometric;
- N = numărul de diviziuni de pe micrometrul ocular corespunzător obiectului.

b. Metoda camerei clare. Se montează camera clară la microscop, se clarifică imaginea obiectului şi se marchează dimensiunile imaginii lui pe hârtie. Se îndepărtează preparatul, se montează micrometrul obiectiv pe platina microscopului şi se desenează pe aceeaşi hârtie câteva diviziuni ale micrometrului, care să încadreze imaginea prepartului.

Se determină lungimea (n) corespunzătoare în mm sau μm, dintre două diviziuni ale micrometrului ocular.

Se determină apoi grosismentul miroscopului (G)

$$G = i/o \text{ unde:}$$

- i = lungimea (n) între două diviziuni ale imaginii micrometrului pe hârtie;
- o = 0,01 mm (10 μm) valoarea unei diviziuni micrometrice.

Se măsoară apoi (mm sau μm), dimensiunea imaginii obiectului (L). Cunoscând grosismentul, mărimea obiectului (L) va fi:

$$L = i/G, \text{ unde:}$$

- L = lungimea obiectului (mm sau μm);
- G = grosismentul microscopului;
- i = dimensiunea în mm sau μm a imaginii obiectului.

BCU IAŞI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

c. Măsurători cu ocular cu şurub micrometric. Se determină iniţial Cm, ca în cazul micrometrului ocular şi obiectiv. Se determină apoi numărul de diviziuni (N) corespunzător dimensiunii obiectului(M) Mărimea obiectului este dată de produsul:

$$M = Cm \times N$$

1.1.11.2. Măsurători microscopice în plan vertical

Măsurarea la microscop a grosimii preparatelor se face cu ajutorul vizei micrometrice (şurubul micrometric). Surubul micrometric este gradat în diviziuni a căror valoare (în mm sau μm) este gravată pe tamburul şurubului.

Se pune la punct iniţial claritatea imaginii pentru planul superior al preparatului şi se notează diviziunea de pe tamburul vizei micrometrice.

Se pune la punct apoi claritatea pentru planul inferior al imaginii, notându-se diviziunea la care a ajuns şurubul micrometric după rotaţie. Diferenţa dintre diviziunea finală şi cea iniţială, înmulţită cu valoarea unei diviziuni (sensibilitatea vizei) reprezintă grosimea preparatului (în mm sau μm).

1.1.12. Determinarea constantelor optice ale microscopului fotonic

1.1.12.1.Puterea de mărire

S-a arătat că puterea de mărire (G) a microscopului se exprimă prin raportul dintre mărimea imaginii şi mărimea obiectului, luând în consideraţie mărimea imaginii situate la distanţa vederii normale, de 25 cm (G =i/o). Există mai multe metode de determinare a puterii de mărire a microscopului.

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

a. Metoda directă, prin calcul. Pe fiecare obiectiv (ob.) şi ocular (oc.) ca şi pe dispozitivul de îmbinare a ocularelor (dispozitiv binocular - db) la microscopul binocular sunt gravate valorile puterii lor de mărire (g, g_1, respectiv g_2). Puterea de mărire (G) a microscopului este egală cu produsul acestor valori: pentru *microscopul monocular* **G = g ob. x $g_1$oc**; pentru *microscopul binocular* **G = g ob. x $g_1$oc. x g_2d b.**

Exemple: La un microscop monocular cu obiectiv 40 şi ocular 10, G = 40 x 10 = 400 ori. La un microscop binocular cu obiectiv 90 (cu imersie), ocular 10 şi dispozitiv de îmbinare 1,5, G = 90 x 10 x 1,5 = 1430 ori.

b. Metoda camerei clare. Pe platina microscopului se aşează micrometrul obiectiv, iar la ocular se montează camera clară sau alt dispozitiv de desenat. Se desenează pe o hârtie câteva diviziuni de pe scala micrometrică, având desenul la distanţa de 25 cm (250 mm) de ochiul observatorului. Se măsoară pe desen distanţa în mm între două diviziuni ale scalei micrometrului. Dacă această distanţă nu corespunde la un număr întreg de mm, se măsoară un interval de un număr de diviziuni, ce corespunde la un număr întreg de mm şi se împarte valoarea în mm la numărul de diviziuni.

Exemplu: 3 diviziuni de pe scala micrometrului de pe desen corespund la 16 mm. O diviziune micrometrică de pe desen are 16 : 3 = 5,33 mm. Ştiind că o diviziune a micrometrului obiectiv are valoarea reală de 0,01 mm şi înlocuind valorile în formula **G = i/o**, se obţine: G = 5,33 : 0,01 = 5,33 x 100 = 533 (puterea de mărire a microscopului).

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

1.1.12.2.Alte constante optice

Pentru aprecierea calităţilor optice şi a performanţelor microscopului fotonic se verifică şi alte constante optice:

a. Puterea de definiţie reprezintă claritatea şi finețea imaginii. Se verifică utilizând o lamă specială de sticlă, cu gradaţii şi o grosime între 0,09 - 0,20 mm.

b. Corecţia aberaţiei de sfericitate - imaginea trebuie să aibă linii nete, fără franjuri şi contururi neclare.

c. Verificarea aberaţiei cromatice - la obiectivele acromate imaginea trebuie să fie fără franjuri roşii sau albastre, ci doar uşoare umbre verzi-violete, iar la obiectivele apocromatice nu trebuie să existe franjuri în centrul imaginii.

d. Verificarea puterii de separare - obiectivele trebuie să permită distingerea celor mai mici amănunte, cu claritate. Se verifică utilizând teste gravate pe sticlă şi diatomee cu striaţii fine.

e. Verificarea planeităţii câmpului - curbura imaginii depinde de ocular şi se verifică introducând în ocular o reţea micrometrică, ale cărei linii trebuie să fie paralele pe toată suprafaţa câmpului microscopic.

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

1.2. Realizarea preparatelor pentru microscopia fotonică. Generalităţi

Studiul structural şi (parţial) funcţional al celulelor, în microscopia fotonică, necesită prelucrarea materialului biologic utilizat printr-un ansamblu de tehnici citomorfologice, citochimice, citoenzimologice etc., anterior observării propriu-zise, adică realizarea *preparatelor microscopice*.

După durabilitatea lor (perioade de menţinere nealterate a morfologiei şi structurii celulelor), preparatele microscopice se clasifică în:

a. Preparate permanente (durabile) - prezintă o rezistenţă îndelungată în timp (uneori de ordinul zecilor de ani). Realizarea preparatelor permanente, necesită, obligatoriu, conservarea materialului biologic (depus pe lama microscopică portobiect fie sub formă de secţiuni fine, fie prin etalare în monostrat-frotiu sau amprentă de organe) prin *operaţiunea de fixare*.

b. Preparate temporare (proaspete sau extemporanee) cu o durată limitată de conservare.

In acest caz, piesa biologică recoltată (fragmentul de organ sau celulele libere), se depun pe lama microscopică şi poate fi examinată direct, sau după colorare.

Obţinerea preparatelor permanente necesită o serie definită de operaţiuni (tratamente) fizice şi chimice ale materialului biologic, indiferent de proveniența sa (fragmente de ţesuturi vegetale, animale, umane, celule libere sau organisme unicelulare), care în ordinea succesiunii lor sunt: *fixarea, includerea, secţionarea, etalarea secţiunilor pe lama portobiect, colorarea* şi *montarea*.

În funcţie de metoda de preparare pentru care s-a optat şi de scopul investigaţiei realizate, succesiunea acestor etape poate fi modificată, sau unele etape pot fi omise.

1.2.1. Fixarea

Fixarea, timp obligatoriu în realizarea preparatelor permanente, are drept scop mobilizarea constituenţilor celulari într-o stare cât mai apropiată de cea vie, naturală, în vederea conservării structurilor şi ultrastructurilor celulare cât şi a realizării etapelor ulterioare de preparare a materialului biologic, pentru observarea microscopică. Deşi mecanismul intim al fixării nu este încă complet elucidat, se pare că acţiunea principală a fixatorilor cito-histologici se exercită, în principal, asupra proteinelor celulare, aceştia determinând insolubilizarea şi, într-un anumit grad, polimerizarea acestor molecule, cu efect în menţinerea nealterată a imaginii citoarhitecturale a preparatului şi prevenirea degradării ţesuturilor.

In funcţie de natura agenţilor utilizaţi, se disting două tipuri (grupe) de metode de fixare:

a. *Fixarea cu agenţi fizici.* Aceste metode constau fie în folosirea diferenţelor de temperatură, fie în deshidratarea celulelor, în scopul fixării acestora.

Dintre variantele de fixare fizică a materialului viu, se pot enumera: *fixarea prin căldură* (în prezent abandonată), *desicarea la temperatura laboratorului*, *desicare la temperaturi scăzute* (*criodesicare*) şi *fixare prin congelare-substituţie*.

Deoarece, în cazul unora din aceste metode, fixarea nu este completă, ea trebuie completată prin acţiunea unui alt fixator, de natură chimică.

b. *Fixarea cu agenţi chimici.* Utilizarea diferiţilor agenţi chimici, pentru fixarea preparatelor, reprezintă metoda cea mai curent utilizată în acest scop. Fixarea chimică se impune nu numai datorită eficienţei sale asupra insolubilizării proteinelor celulare, ci şi datorită altor calităţi cum ar fi: efectul asupra glucidelor şi lipidelor, penetrabilitatea în piesele biologice, etc.

În funcţie de complexitatea compoziţiei, agenţii fixatori chimici se pot clasifica în:

BCU "ALEXANDRU IOAN CUZA" UNIVERSITY LIBRARY

- **fixatori simpli**: formaldehida (formolul) – agentul cel mai utilizat în fixare şi etanolul (70 – 100%);
- **amestecuri fixatoare**: sunt formate din doi sau mai mulţi fixatori simpli, fiind completate, în unele cazuri, cu unele substanţe cu rol de tamponare a pH-ului.

Principalele amestecuri fixatoare (utilizate în microscopia optică şi cea electronică), se pot clasifica, în funcţie de caracteristicile lor chimice, în patru grupe: *amestecuri cromo-osmice*, *amestecuri cromice* (fără tetraoxid de osmiu şi acid acetic), *amestecuri pe bază de metale grele* (fără crom şi tetraoxid de osmiu) şi *amestecuri cromo-acetice*. In afara acestor amestecuri, se pot utiliza şi alţi fixatori compuşi, cu rezultate asemănătoare: amestecul *formol-calciu*, *fixatorii Clarke şi Carnoy* şi fixatorii *fixatorii Bouin, Susa* şi *Heidenhein*.

Deoarece nu există un fixator cu aplicaţii universale, alegerea unui fixator simplu sau a unui amestec fixator pentru o observaţie microscopică precisă, trebuie să ţină cont de mai multe criterii, dintre care se poate enumera: tipul celular (tisular) investigat, detaliile structurale urmărite şi coloraţia care urmează a fi făcută.

Fixarea fragmentelor de organe se realizează în imersia acestuia în soluţia fixatoare, pentru un interval de timp dictat de natura fixatorului sau scopul observaţiei microscopice. Frotiurile de celule se acoperă, de obicei, cu soluţia fixatoare, prin picurare.

1.2.2. Includerea în parafină

Parafina (amestec de hidrocarburi alifatice) este mediul clasic şi cel mai utilizat şi în prezent pentru includerea pieselor biologice, în vederea secţionării lor ulterioare. Pentru o penetrare cât mai bună a pieselor biologice cu parafină –

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

condiţie necesară realizării unor secţiuni optime – includerea se prezintă ca o operaţie complexă, care necesită parcurgerea unei succesiuni de etape necesare:

a. Deshidratarea materialului fixat

Se realizează în scopul eliminării apei din celule, deoarece parafina nu este solubilă în apă. Deshidratarea fragmentelor tisulare se face în prezenţa unui agent anhidru, capabil să absoarbă apa din celule (uzual alcool absolut şi mai rar acetonă). Practic, materialul biologic se introduce succesiv în băi de etanol cu concentraţii crescânde (de exemplu: între 50 – 96^0), la temperatura camerei, pentru a obţine o deshidratare lentă şi progresivă şi nu una brutală, ce poate produce retracţia ţesuturilor.

b. Clarificarea

Constă în tratarea piesei biologice cu un solvent organic miscibil cu parafina, ce favorizează impregnarea celulelor cu parafină. In acest scop, materialul este trecut prin mai multe băi (de regulă 3), reprezentate de unul din următorii compuşii : toluen, benzen, xilen sau cloroform.

c. Impregnarea cu parafină

Permite pătrunderea parafinei, aflată în stare lichidă, în celulele piesei biologice. Materialul biologic este trecut prin mai multe băi succesive de parafină, la termostat (56^{0}C).

d. Includerea propriu-zisă

Se instalează prin introducerea fragmentului organic impregnat, în parafină lichidă turnată într-o formă delimitată de o matriţă metalică, de plastic sau carton. Prin răcirea parafinei lichide, la temperatura camerei, aceasta se solidifică treptat, rezultând un bloc de material solid cu piesa biologică inclusă, apt pentru a fi secţionat ulterior.

În afară de parafină, includerea materialului biologic se poate realiza şi în alte materiale, a căror alegere se bazează, în primul rând, pe consistenţa ţesutului

pe care se fac observaţiile microscopice. Dintre variantele de includere, se pot enumera: includere în paraplast, includere în celoidină, includere în dietilen şi polietilen glicol, includere în gelatină etc.

1.2.3. Secţionarea

Deoarece lumina vizibilă nu poate străbate decât preparatele cu grosimi foarte mici, secţionarea materialului biologic inclus apare ca o operaţie esenţială în cadrul etapelor realizării preparatelor microscopice.

Secţionarea se efectuează cu ajutorul unor aparate speciale – microtoame.

In funcţie de modalitatea de realizare a secţiunilor, microtoamele se clasifică în:

- *microtoame cu mişcare verticală* – în care piesa (sub acţiunea mişcării portobiectului) efectuează o deplasare pe verticală, iar cuţitul de secţionare este fix;
- *microtoame cu mişcare orizontală* – la care piesa (sau cuţitul) se deplasează orizontal, pentru secţionare. Înainte de secţionarea propriu-zisă, blocul de parafină cu preparatul se fasonează sub formă de trunchi de piramidă.

În practica anatomopatologică, sau histochimică, secţionarea ţesuturilor proaspete, sau a celor permanente, fixate, se poate realiza cu ajutorul altor tipuri de microtoame: *microtomul de congelare* şi *criotomul*.

În cazul microtomului de congelare, piesele fasonate sau organul proaspăt sunt îngheţate pe portobiect, înainte de secţionare, sub acţiunea vaporilor de anhidridă carbonică, proveniţi dintr-o butelie metalică ataşată microtomului. In criotomie, secţionarea se practică la temperatură scăzută şi constantă (între –12 şi –30°C), deoarece microtomul este plasat într-o cameră izotermă, răcită de un agregat cu freon. Materialul biologic este congelat în prealabil, prin imersarea într-un lichid de refrigerare (azot lichid la -196°C).

BCU CLUJ-CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

1.2.4. Etalarea şi lipirea secţiunilor

Constau în întinderea şi fixarea secţiunilor pe lama microscopică, în vederea colorării lor.

Metodele de etalare diferă, în funcţie de mediul de includere folosit pentru secţionare. Astfel, secţiunile prin parafină, paraplast etc., seriate sub formă de panglici, pot adera corespunzător (fără pliuri), fie prin etalarea lor iniţială pe suprafaţa apei încălzite la bain-marie, fie prin etalarea lor directă pe lama microscopică, acoperită cu gelatină, albumină, amidon etc. După etalare, secţiunile se lipesc pe lamă prin incubare la termostat (37^0C), operaţie ce determină îndepărtarea apei în exces.

1.2.5. Colorarea

Colorarea este o etapă esenţială a realizării preparatelor microscopice, deoarece celulele (datorită dimensiunilor reduse şi a indicelui de refracţie scăzut) sunt în general dificil de observat în lumină vizibilă. In consecinţă, colorarea selectivă a diferitelor structuri celulare măreşte contrastul intern şi capacitatea de investigare a organizării celulare.

Deşi se admite că, în general, mecanismele colorării sunt de natură chimică (reacţia colorantului cu diferite substraturi moleculare celulare, în special proteine), există şi diferite fenomene fizice implicate în realizarea unor colorații selective, dintre care se pot aminti: *penetrarea mecanică* a colorantului în structurile biologice, precum şi *adsorbţia* sau *absorbţia* substanţelor colorate de către elementele tisulare sau celulare.

În toate cazurile, însă, nuanţa unui compus (reactiv) de culoare apare ca o consecinţă a absorbţiei selective de către acesta a unei radiaţii luminoase

monocromatice din spectrul vizibil şi a reflectării radiaţiei respective (interpretată de analizatorul vizual ca informaţie de culoare).

Coloranţii utilizaţi în tehnicile cito-histologice sunt compuşi organici, în majoritatea lor de natură aromatică. Din punct de vedere chimic orice colorant cuprinde două grupări:

- o grupare *cromoforă* – care conferă culoarea propriu-zisă a colorantului (Fig. 16). Grupările cromofore conţin în structurile lor nuclee benzenice, atomi de N, C sau H. O caracteristică esenţială a acestor grupări este frecvenţa unor duble legături conjugate, aflate în relaţie directe cu puterea de colorare a compusului respectiv;
- o grupare *auxocromă* – ce intervine în fixarea substanţei colorante pe substratul celular. Chimic, grupările auxocrome sunt funcţii simple, polare sau semipolare, cu legături simple în moleculă (grupările hidroxil, amino, carboxil, cian etc.).

O serie de substanţe dobândesc capacitatea de a colora numai în urma cuplajului specific al grupărilor auxocrome cu substratul, produsă, de regulă, în urma unei reacţii de ionizare.

Clasificarea coloranţilor utilizaţi în citologie se realizează, cel mai frecvent, după două criterii:

a. După **originea** lor, coloranţii se împart în:

- *coloranţi naturali*, de origine vegetală (safranină, hematoxilină) sau animală (carmin);
- *coloranţi sintetici* (albastrul de metilen etc.).

b. După **caracterul chimic al grupărilor auxocrome**, se deosebesc:

- *coloranţi acizi* (anionici) – la care gruparea auxocromă este încărcată negativ (de ex. HCO_3^-), ei reacţionând cu componentele moleculare celulare încărcate pozitiv; cel mai frecvent utilizat colorant acid este eozina;

- *coloranți bazici* (cationici) – la care gruparea auxocromă este încărcată pozitiv (de exemplu: NH_2^+). Acești coloranți prezintă afinitate pentru grupările moleculare negative, cei mai utilizați coloranți din acest grup fiind violetul de metil, thionina și hemalaunul;
- *coloranți neutri* – reprezintă amestecuri apoase, în anumite proporții, de coloranți bazici și acizi (eozinatul de albastru de metilen și eozinatul de azur de metilen).

Metode de colorare

Tehnicile de colorare utilizate în citologie se clasifică după mai multe criterii:

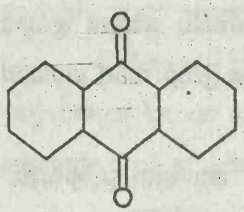
a. După **numărul coloranților utilizați**, se deosebesc:

- *colorații simple* – ce constau în folosirea unui singur colorant, fie pentru citoplasmă fie pentru nucleu;
- *colorații combinate* – care constau în colorarea succesivă a preparatelor, cu doi sau mai mulți coloranți. Asemenea metode de colorare se aplică pentru colorarea diferențială a diferitelor structuri ale unui țesut.

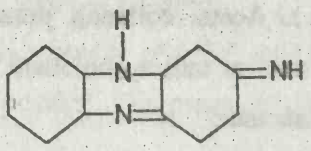
b. După **natura interacțiunii colorant-substrat**:

- *colorații directe* – care constau în fixarea nemijlocită a colorantului pe structurile biologice;
- *colorații indirecte* (prin *mordansare*) – ce necesită prezența unui mediator sau mordant pentru fixarea colorantului pe componentele celulare; combinația dintre colorant și mordant poartă numele de *lac*.

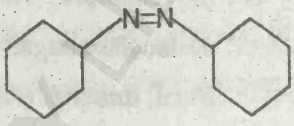
BCU IAȘI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



antrachinonă



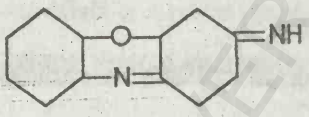
azină



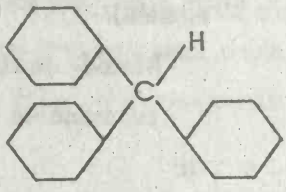
azoică

—N=N—

azometină



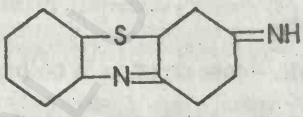
oxazină



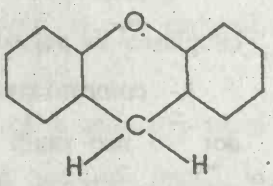
trifenilmetan

=C=NH

cetimină



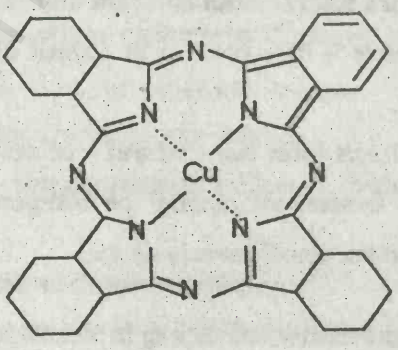
tiazină



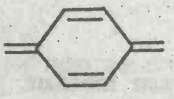
xantină

—N=

indamină



ftalocianină



quinonă

Fig. 16. Principalele grupări cromofore

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

c. După **intensitatea colorării**:

- *colorații progresive* – în care intensitatea culorii crește în timp; pentru a obține o tentă optimă de culoare a unei anumite structuri celulare și pentru a preveni colorarea nediscriminativă, nedorită, a altor componente ale celulei, colorația se oprește după o perioadă de timp, prin spălare;
- *colorații regresive* – care constau în practicarea unei supracolorări inițiale, nediferențiate, a întregului preparat, după care excesul de colorant se îndepărtează cu ajutorul unor substanțe decolorante sau diferențiatori, pentru a releva doar structurile celulare de interes pentru studiul microscopic.

d. După **condiția materialului biologic**, se disting:

- *colorații vitale* – care se realizează pe preparatele proaspete, nefixate. Colorația persistă, de regulă, atât timp cât supraviețuiesc celulele, după care intensitatea nuanței de culoare se estompează;
- *colorații permanente* – se realizează pe preparatele permanente.

Colorarea secțiunilor parafinate este o operație complexă care cuprinde mai mulți timpi de lucru, grupați în trei etape principale:

a. Etapa de precolorare include:

✓ *deparafinarea* – constă în dizolvarea parafinei, prin trecerea secțiunilor lipite pe lamă prin mai multe băi cu solvenți ai parafinei (xilol, benzen, toluol);

✓ *hidratarea* – are rolul de a îndepărta solvenții parafinei, ce împiedică colorarea; se realizează prin trecerea succesivă a lamelor cu secțiuni prin băi de alcool etilic de concentrații descrescânde. In continuare, secțiunile se introduc în apă distilată (dacă soluția colorantă este apoasă), sau se transferă direct în colorant (dacă soluția colorantă este alcoolică).

b. Etapa de colorare propriu-zisă – constă în aplicarea colorantului pe secțiunile precolorate, cel mai frecvent prin acoperirea acestora cu soluția colorantă.

BCU "CAROL I" UNIVERSITY LIBRARY

c. Etapa de postcolorare cuprinde:

✓ *spălarea* preparatelor cu apă distilată, necesară opririi acţiunii colorantului şi îndepărtării excesului de colorant;

✓ *deshidratarea*, necesară permanentizării acţiunii colorantului, se realizează prin trecerea secţiunilor prin cinci băi cu alcool etilic, de concentraţii crescânde;

✓ *clarificarea* constă în îndepărtarea excesului de alcool din preparat, conferind secţiunilor transparenţa necesară unei observări microscopice corespunzătoare; se realizează prin imersarea succesivă a secţiunilor în băi de xilol, toluol şi benzen.

1.2.6.Montarea secţiunilor sub lamelă

Se realizează în scopul protecţiei mecanice a secţiunilor, a conservării coloraţiilor realizate, cât şi al obţinerii unor calităţi optice a preparatelor (transparenţă, indice de refracţie) ce fac posibilă o vizualizare microscopică optimă. Mediile de montare a preparatelor permanente se clasifică în:

a. *medii apoase* (miscibile cu apa) – se utilizează în cazul în care secţiunile nu au fost deshidratate (de exemplu, amestecul glicerină-gelatină). Deoarece aceste medii au un indice de refracţie scăzut şi o capacitate redusă de conservare a coloranţilor, sunt puţin recomandate;

b. *medii de montare miscibile cu alcoolul* – se utilizează pentru montarea secţiunilor deshidratate în alcool etilic de concentraţie crescută (80^0 – 85^0). Se consideră că aceste medii asigură o conservare bună a reacţiilor histochimice şi de culoare. Cel mai utilizat mediu miscibil cu alcoolul este *euparolul*, care se aplică sub formă de picături pe lama cu secţiunea lipită şi colorată. Preparatul montat se acoperă apoi cu lamela şi este incubat la 37^0C sau la temperatura camerei, pentru uniformizarea grosimii şi uscarea mediului de montare;

c. *medii anhidre* (miscibile cu hidrocarburile aromatice) – se utilizează în cazul secţiunilor complet deshidratate şi impregnate cu un solvent al materialului de montare. Cel mai utilizat mediu de acest tip este *balsamul de Canada*, dar se pot folosi şi alte răşini sintetice.

Preparatele astfel realizate şi etichetate, sunt pregătite pentru observarea microscopică, sau pot fi păstrate în cutii sau colecţii (histoteci).

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

1.3. Modele celulare utilizate în microscopia fotonică

1.3.1. Celule de drojdii (levuri)

Drojdiile (levurile) sunt microorganisme eucariote ce aparţin microfungilor, fiind predominant unicelulare în stare vegetativă.

Pentru ilustrarea principalelor etape de prelucrare a celulelor de drojdii, în vederea observării lor microscopice, se utilizează frecvent două specii, semnificative atât din punct de vedere alimentar, cât şi a importanţei lor în cercetarea fundamentală.

Schizosaccharomyces pombe (drojdia de bere africană) – prezintă celule alungite, cilindrice, cu capetele rotunjite, de 14–20µm lungime şi 5-7µm diametru transversal. Se reproduce asexuat prin diviziuni mitotice, în urma cărora rezultă două celule fiice, identice dimensional cu celula mamă (diviziune binară, sciziparitate sau fisiune binară).

Saccharomyces cerevisiae (drojdia de bere) – cu celule sferic-ovoide, ce se reproduc printr-o formă particulară de diviziune mitotică – diviziunea prin înmugurire – în urma căreia rezultă o celulă fiică (mugure) mai mică decât celula mamă.

În afară de reproducerea asexuată, prin mitoză, în anumite condiţii de cultură (în special carenţe nutritive), cele două cele două specii se pot reproduce şi sexuat, prin conjugare, dacă în cultură există celule ce aparţin la două tipuri opuse de împerechere (+ şi -).

In urma conjugării rezultă un zigot diploid, care se trarsformă, de regulă imediat, într-o ască reniformă (la *S. pombe*), care se divide meiotic, rezultând patru ascospori haploizi, rotunzi, care pot iniţia un nou ciclu asexuat, în condiţii

favorabile de mediu. La *Sacch. cerevisiae*, celulele diploide se transformă, în condiţii subnutritive, în asce sferic-ovoide, care produc prin sporulare patru ascospori sferici, ce se eliberează după liza celulei ascale.

Diferenţele dintre ciclurile complete de dezvoltare ale celor două specii rezultă din starea de ploidie caracteristică fiecăreia dintre ele, în faza vegetativă: stare haploidă la *S. pombe* şi stare diploidă la *Sacch. cerevisiae*.

Drojdiile pot fi uşor menţinute în condiţiile de laborator, atât în stare uscată şi congelată (liofilizată) cât şi pe medii adecvate (sub formă de *culturi stoc*). Ele pot fi cultivate şi crescute în vederea cercetărilor operative, atât în suspensie în medii lichide complete, cât şi pe suprafaţa mediilor solide, agarizate.

Uşurinţa întreţinerii şi creşterii celulelor de drojdii în condiţii de laborator, existenţa lor în stare unicelulară, caracteristicile morfocitologice ilustrative pentru celula eucariotă, precum şi simplitatea, în general, a metodelor de prelucrare, au stat la baza alegerii acestor organisme, drept model pentru ilustrarea principalelor etape de realizare a preparatelor pentru microscopia fotonică. Unele dintre aceste etape prezintă caracteristici comune cu cele descrise în partea generală a capitolului, iar altele sunt particulare pentru celulele de drojdii. Etapele de preparare vor fi tratate integral şi separat, pentru fiecare dintre cele două mari tipuri de preparate microscopice ce se pot realiza pe celulele de levuri, similar celulelor vegetale şi animale: preparate temporare şi preparate permanente.

1.3.1.1. Realizarea preparatelor temporare (proaspete) de drojdii

Ca şi în cazul altor tipuri de celule, preparatele proaspete de drojdii au o durată limitată, fiind utilizate în scopul realizării unor observaţii imediate, operaţionale, atât direct, pe celule necolorate (în câmp luminos, prin contrast de

fază, interferență diferențială sau câmp întunecat), cât şi pe celule colorate prin diverse metode (după **Campbell şi Duffus, 1991**) .

A] Montarea celulelor

Există o largă varietate de metode de realizare a preparatelor proaspete de celule de drojdii, care pot fi sintetizate în modul următor: **preparate umede** (în picătură), **preparate . uscate, metoda picăturilor suspendate şi metoda culturilor pe lamă**, fiecare având anumite specificații, în funcție de scopul observațiilor întreprinse.

a. Preparatele umede

Metoda se realizează prin depunerea unei cantități mici de celule pe lama microscopică, cu ajutorul unei anse, într-o picătură de lichid de montare (în general apă de robinet sau NaCl 0,9%, mai rar mediu de cultură); celulele se amestecă apoi bine cu mediul de montare. Preparatul se acoperă imediat cu lamela şi poate fi observat la microscop (în câmp luminos sau contrast de fază). Celulele depuse pe lamă pot fi prelevate fie direct din coloniile crescute pe mediu solid, agarizat, fie din sedimentul celular obținut după centrifugarea culturilor lichide (10min., 2500rpm), după îndepărtarea mediului de cultură.

Pentru a obține etalarea celulelor în monostrat, evitându-se suprapunerea acestora, este indicat ca după acoperirea preparatului cu lamela, excesul de fluid să se absoarbă fie cu ajutorul unei hârtii de filtru, la marginea lamelei, fie prin presarea acesteia cu hârtie de filtru. Imobilizarea celulelor după montare poate fi obținută, de asemenea, prin uscarea preparatului în aer, timp de câteva minute, sau, în unele cazuri, prin acoperirea lamelei cu un strat fin de gelatină, ovalbumină sau albuş de ou, înainte de plasarea acesteia pe lamă.

b. Preparatele uscate (frotiurile celulare)

Se deosebesc de cele umede prin faptul că materialul biologic, reprezentat de suspensii celulare de drojdii, se usucă inițial, înainte de a fi montat într-o

picătură de lichid. Există, în principal, două tehnici de realizare a preparatelor uscate de levuri:

- *frotiurile pe lamă* se prepară în următoarele etape:

✓ se depune o picătură din suspensia celulară în apropierea unei extremităţi a lamei microscopice;

✓ cu ajutorul unei alte lame, cu marginea rodată, menţinută în poziţie oblică, se întinde picătura până la marginea opusă a lamei microscopice; pentru a se obţine etalarea în strat cât mai subţire a celulelor; întinderea picăturii trebuie să se facă cu o presiune constantă, crescută, şi cu o viteză uniformă de deplasare a lamei de etalare;

✓ frotiul se usucă, de obicei prin agitare în aer, la temperatura camerei;

✓ se depune o picătură de mediu de montare în centrul frotiului şi se acoperă cu lamela; celulele astfel prelucrate pot fi observate direct la microscop, pot fi colorate (colorații vitale) sau pot fi fixate (în cazul preparatelor permanente).

- *frotiurile pe lamelă*, mai dificile, presupun, în principiu, aceleaşi trepte ca şi în cazul celor realizate pe lama microscopică. Avantajul acestora derivă din faptul că preparatul este plasat mai aproape de lentilele obiectivului microscopului.

Pentru a preveni o uscare prea avansată a celulelor, care poate altera imaginea microscopică a acestora, este recomandat, cu excepţia examinărilor imediate, ca preparatele să se "sigileze", prin aplicarea de parafină topită sau lac de unghii pe marginile lamelei, înainte de depunerea acesteia peste specimen. Sigilarea permite, în acelaşi timp, şi observaţii repetate pe acelaşi material biologic.

c. Metoda culturilor suspendate

Această metodă este utilă pentru examinarea proceselor morfogenetice şi a aranjamentului reciproc a celulelor de drojdii în cultură, prin microscopie în câmp

luminos şi în contrast de fază, dar cu eficienţă mai redusă. S-au consacrat două variante ale acestei metode:

- *metoda culturilor lichide suspendate* (Fig. 17a) cuprinde următoarele secvenţe:

✓ se amestecă o picătură dintr-o cultură lichidă de drojdii cu 1 ml de gelatină topită, pe o lamă microscopică sterilă:

✓ se depune o picătură din acest amestec pe o lamelă, se inversează lamela şi se depune deasupra depresiunii circulare a unei lame, sau pe un inel de plastic sau sticlă, la suprafaţa unei lame plate;

✓ se sigilează lamela pe lama microscopică, cu vaselină sau lac de unghii;

✓ se transferă întregul ansamblu într-o cutie Petri şi se incubează la termostat (la temperatura optimă de creştere a celulelor speciei studiate);

✓ se realizează periodic observaţii, după scoaterea preparatului din cutia Petri.

- *metoda blocurilor de agar suspendate* (Fig. 17b) constă în succesiunea următoare de etape:

✓ se însămânţează celulele, cu ajutorul ansei, pe un strat de agar solid, steril, de cca. 2 mm grosime, depus pe fundul unei plăci Petri;

✓ se excizează un pătrat de mediu de cultură cu celulele dispersate, cu ajutorul unui bisturiu flambat şi se aplică pe o lamelă sterilă (cu suprafaţa mediului lipsit de celule lipită de lamelă);

✓ se aplică lamela cu blocul de agar pe un inel de sticlă sau plastic situat pe o lamă microscopică; grosimea inelului trebuie să depăşească uşor înălţimea blocului de agar;

✓ se introduce o picătură de apă în spaţiul dintre blocul de agar şi lamă;

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

✓ întregul ansamblu se introduce într-o placă Petri ce conţine o rondelă de hârtie de filtru umectată în glicerol 20-50%, pe un suport de sticlă de forma literei "V";

✓ se incubează la temperatura optimă de dezvoltare a celulelor.

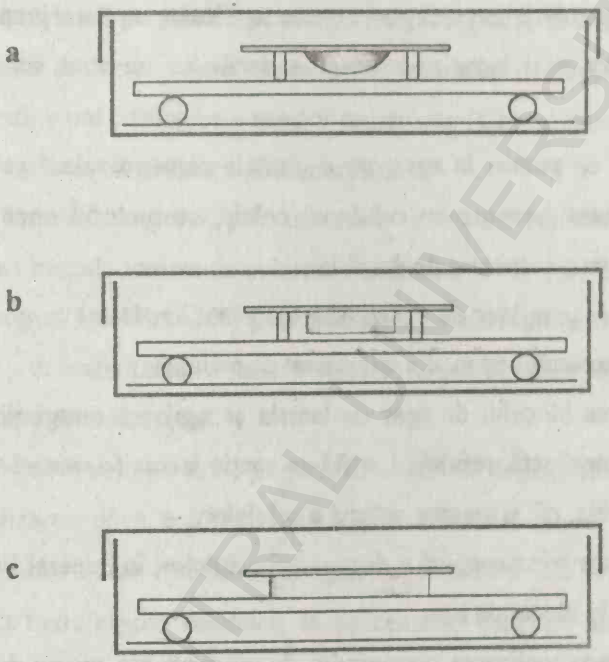


Fig. 17. Metode de montare a celulelor de drojdii: a – metoda culturilor lichide suspendate; b – metoda blocurilor de agar suspendate; c – metoda culturilor pe lamă (după Streiblova, 1991)

d. Metoda culturilor pe lamă

Această tehnică permite realizarea de observaţii microscopice directe asupra stadiilor de dezvoltare ale culturilor de drojdii.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Dacă monitorizarea microscopică a creşterii drojdiilor miceliene, sau a celor care formează pseudomiceliu se poate face prin examinarea coloniilor crescute pe un strat de agar subţire şi acoperite cu lamele, în plăci Petri (Fig. 17c), în cazul drojdiilor fisipare sau care înmuguresc, au fost puse la punct metode de creştere a culturilor pe lamă. Astfel, observarea microscopică a detaliilor diviziunii nucleare şi ale sporulării necesită parcurgerea următoarelor etape preparatorii:

✓ acoperirea unei lame microscopice sterile cu un strat subţire de mediu agarizat;

✓ trasarea de şanţuri în agar, pe o direcţie perpendiculară pe axul lung al lamei, şi inocularea acestora cu celule cu celule, cu ajutorul unor fibre fine de sticlă, acoperită cu o suspensie de drojdii;

✓ decuparea unui bloc de agar astfel inoculat (2 x 4mm) cu un bisturiu steril şi îndepărtarea excesului de mediu solidificat de pe lamă;

✓ acoperirea blocului de agar cu lamela şi sigilarea marginilor acesteia pe lamă, cu ceară parafinată, rezultând astfel un spaţiu închis (o cameră de cultură) ce asigură atât nutriţia, cât şi aerarea optimă a celulelor;

✓ observarea microscopică a dezvoltării celulelor, în general bine spaţiate în şanţurile trasate în blocul de agar.

Pentru maximalizarea consumului de nutrienţi din mediu de către celule, culturile pe lamă se pot realiza în modul următor:

✓ lamele microscopice se introduc în plăci Petri încălzite şi se acoperă cu un strat subţire de agar nutritiv topit;

✓ după solidificarea mediului, suprafaţa lamelor se însămânţează cu celule, care se acoperă ulterior cu lamele;

✓ se practică mai multe şanţuri în agar, sub lamelă, cu ajutorul unui ac steril, în vederea facilitării aerării;

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

✓ se răstoarnă placa şi se introduce o rondelă de hârtie de filtru umezită pe fundul său, pentru a împiedica deshidratarea celulelor;

✓ se readuce placa în poziţie normală, se decupează lamele cu celulele acoperite cu lamele din mediu, cu ajutorul unui bisturiu steril şi se curăţă partea inferioară a lamei de mediul agarizat rezidual;

✓ se instalează preparatul pe platina microscopului, în vederea observării.

Există şi camere de microcultură a celulelor de drojdii, special utilizate pentru investigaţiile citologice a acestor organisme (**Cole şi Kendrick, 1968**).

B] Colorarea preparatelor temporare

În decursul timpului, prin utilizarea diferiţilor coloranţi specifici, au fost puse la punct metode variate de colorare a celulelor de drojdii, care pun în evidenţă atât unele organite celulare, cât şi incluziunile citoplasmatice. Remarcându-se prin simplitatea şi operativitatea lor, aceste metode se pot clasifica, în funcţie de tipul de preparat temporar realizat, în:

a. Metode de colorare a preparatelor umede (coloraţii vitale)

Utilizarea unor coloranţi cum sunt: *albastrul de metilen, albastrul de benzidină, albastrul de Nil, rozul Bengal, roşul neutru* sau *verdele Janus*, ce nu posedă efect toxic asupra celulelor, la concentraţii cuprinse între 0,1–100 μg/ml, permite observarea satisfăcătoare a organizării interne a celulelor de drojdii. În funcţie de structura specifică pentru care aceşti coloranţi prezintă afinitate, coloraţiile vitale aplicate pe celulele de drojdii se pot clasifica în:

□ *Coloraţia vitală a mitocondriilor*

Coloraţia vitală şi supravitală a mitocondriilor cu *verde Janus B* conferă acestor organite o nuanţă verde-albăstruie. Această culoare se datorează acţiunii citocrom-oxidazei mitocondriale asupra colorantului, care menţine substanţa în

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

forma ei redusă, colorată. Citoplasma înconjurătoare apare necolorată, în contrast cu mitocondriile. Etape de lucru:

✓ se dizolvă 5 mg verde Janus B în 100 ml soluţie apoasă de glucoză 1% şi se aerează soluţia de colorant, prin barbotarea unui curent de aer, timp de 30 min.;

✓ se depune o picătură de suspensie de drojdii pe lamă şi se amestecă cu un volum egal din soluţia proaspătă de verde Janus B;

✓ se observă imediat celulele la microscop (obiectivele 40x–100x), fără a acoperi preparatul cu lamela.

□ *Coloraţia vitală a vacuolelor*

Sistemul vacuolar (vacuomul) drojdiilor este implicat în importul, exportul şi reciclarea intracelulară a diferiţilor compuşi chimici. Aceste roluri apar evidente în cazul coloraţiei vitale a vacuolelor cu *roşu neutru*. Colorantul este preluat activ de către vacuole din citoplasmă, conferindu-le o nuanţă roşie-purpurie. După circa 15-20 min., colorantul este însă eliberat din vacuole, ceea ce face ca nuanţa lor să se estompeze treptat în timp, iar citoplasma să se coloreze în roz-maroniu. Interesante diferenţe citologice, prin utilizarea acestui colorant, apar în urma colorării celulelor foarte tinere sau bătrâne de drojdii.

Tehnica de lucru:

✓ se prepară soluţie apoasă de roşu neutru (1%);

✓ pe lama microscopică se amestecă o picătură de suspensie de drojdii cu un volum egal de soluţie colorantă şi se acoperă cu lamela;

✓ preparatul microscopic se observă imediat (obiectivele 40x–100x).

b. Metode de colorare a frotiurilor celulare

Prin aceste metode nu se realizează coloraţii vitale, deoarece celulele sunt omorâte în prealabil, prin procedurile de imobilizare (sub formă de frotiuri). Coloraţia frotiurilor este mai durabilă în comparaţie cu cea a preparatelor umede.

□ *Colorarea glicogenului*

BCU IASI CENTRALA UNIVERSITARA LIBRARY

Depozitele intracitoplasmatice de glicogen din celulele de drojdii, formate din molecule de glucoză polimerizate, constituie o importantă rezervă energetică pentru aceste organisme. Invizibile în celulele vii, aceste depozite devin observabile microscopic prin tratamentul cu *iodo-iodură de potasiu*, în urma căruia polimerul precipită sub formă de mici granule. Glicogenul se colorează cu iodo-iodură de potasiu în roşu-maroniu, iar proteinele citoplasmatice în galben. Depozitele colorate de glicogen dispar temporar, după o scurtă încălzire a celulelor, la 37°C.

Tehnica de lucru:

✓ se dizolvă 1g de iod metalic şi 2g de iodură de potasiu în 25ml apă distilată;

✓ după dizolvarea completă a substanţelor, se completează volumul soluţiei la 100ml, cu apă distilată;

✓ se prepară frotiuri celulare pe lamă, în strat cât mai subţire (prin procedeul descris în paragraful 1.b);

✓ după uscare, se acoperă frotiul cu soluţia colorantă (din sticluţa picurătoare) şi se colorează 10 – 15min.;

✓ se scurge excesul de colorant, se acoperă o porţiune a frotiului cu lamela şi se observă imediat la microscop (obiectivele 40x sau 100x, imersie în apă).

□ *Colorarea volutinei*

Volutina – important polimer de rezervă al celulelor de drojdii – posedă în moleculă grupări fosfat cu caracter acid, ce pot reacţiona cu coloranţi bazofili, de tipul *albastrului de metilen* (sau a *albastrului de toluidină*). În urma tratamentului, vacuolele se colorează în albastru închis sau violet, iar citoplasma în albastru-deschis.

BCU "ION CREANGĂ" UNIVERSITY LIBRARY

Tehnica de lucru:

✓ se prepară soluţia de colorant din: 10 g albastru de metilen, 30 ml alcool absolut, 1 ml soluţie apoasă de KOH (1%) şi 100 ml apă distilată;

✓ se prepară frotiuri celulare, uscate în aer;

✓ se colorează frotiurile cu soluţia de albastru de metilen, prin acoperire, timp de 30 min.;

✓ se decolorează celulele cu soluţie de H_2SO_4 (1%), timp de 1 min.;

✓ se spală preparatele cu apă distilată, se scurg, se acoperă cu lamele şi se examinează microscopic (40x, 100x, imersie în apă).

□ *Colorarea granulelor lipidice*

Deşi incluziunile lipidice sunt detectabile în citoplasmă prin microscopie cu contrast de fază, sub formă de corpusculi refringenţi, ele sunt dificil de diferenţiat de alte tipuri de granulaţii celulare. De aceea, se recomandă coloraţia granulelor lipidice cu *negru Sudan B*, ce conferă cel mai bun contrast cunoscut. Coloraţia se bazează pe simpla difuzie şi acumulare a colorantului în depozitele de lipide, acestea colorându-se în gri-albăstrui, în contrast cu citoplasma, care capătă o coloraţie roz-pal.

Tehnica de lucru:

✓ se prepară colorantul dizolvând 0,5 g de negru Sudan B în 100 ml alcool etilic 70%. Se dizolvă substanţa prin agitare energică, se lasă la întuneric 24 ore şi se filtrează înainte de utilizare;

✓ se prepară frotiuri, uscate în aer;

✓ se colorează frotiurile prin acoperire cu soluţia colorantă, 30 min.;

✓ se scurge excesul de colorant şi se usucă preparatele;

✓ se decolorează cu alcool etilic 50%;

✓ se spală cu apă distilată, se usucă şi se examinează preparatele, fără lamelă (40x, 100x cu imersie în ulei de cedru).

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- *Colorarea lipidelor mascate*

Lipidele mascate, cu caracter acid, pot fi puse în evidenţă cu *albastru de Nil* (sulfat de albastru de Nil). Moleculele lipidice se colorează roz-pal cu acest colorant, iar nucleii în albastru-închis.

Tehnica de lucru:

- ✓ se prepară frotiuri celulare, uscate prin încălzire uşoară;
- ✓ se colorează frotiurile, prin acoperire, cu soluţie apoasă saturată de albastru de Nil, 20 min.;
- ✓ se spală cu apă;
- ✓ se decolorează preparatele cu acid acetic glacial 1%, 15-20 min. (în funcţie de aspectul preparatului);
- ✓ se spală din nou cu apă distilată, se aplică lamele şi se observă microscopic (40x, 100x, imersie cu apă).

1.3.1.2. Realizarea preparatelor permanente de drojdii

Obţinerea de preparate durabile, care permit observaţii repetate şi o conservare îndelungată a celulelor de drojdii, este, în general, mai puţin laborioasă decât prepararea secţiunilor prin ţesuturile vegetale, animale sau umane. Aceasta se datorează, în primul rând, faptului că drojdiile sunt, în general, organisme unicelulare, care nu necesită etape speciale de includere şi secţionare în vederea prelucrării lor pentru observaţiile microscopice.

Ţinând cont de aceste considerente, etapele esenţiale de realizare a preparatelor permanente de drojdii pot fi sintetizate în modul următor.

A] Imobilizarea celulelor

Înainte de a fi supuse unor proceduri complicate de fixare şi colorare, este recomandabil ca celulele de drojdii să adere ferm la suprafaţa lamei sau lamelei

microscopice. În acest scop se pot aplica una din următoarele metode de imobilizare:

a. *prepararea de frotiuri pe lamă,* prin dispersia celulelor într-un strat cât mai subţire, cu o baghetă de sticlă sau marginea rodată a unei lame microscopice. Frotiurile se usucă în aer, evitându-se grăbirea uscării celulelor prin încălzire;

b. *realizarea aderenţei suspensiilor celulare la suprafaţa lamelelor acoperite cu un strat subţire de ovalbumină.* Pentru aceasta, se amestecă albuşul unui ou cu un volum egal de apă distilată, într-un cilindru cotat, prin agitare energică. Se lasă amestecul în repaus o perioadă de timp, pentru precipitarea fracţiunilor (flocoanelor) de globuline insolubile, iar fracţiunea superioară, ce conţine albumină solubilă, se decantează într-un vas. Se depune o picătură de lichid decantat pe lamelă, se etalează cu pulpa degetului sau un băţ de chibrit şi se usucă în aer. În final, peste stratul de ovalbumină, se aplică o picătură de suspensie de drojdii, care se usucă, de asemenea, în aer;

c. *realizarea aderenţei celulelor la lamelă cu ajutorul adezivului Haupt.*

Adezivul Haupt se prepară prin dizolvarea a 1 g gelatină pură în 100 ml apă distilată, la 30°C. Când gelatina s-a dizolvat, se adaugă 2 g cristale de fenol şi 15 ml glicerol. Odată preparat, se etalează o picătură de adeziv pe lamelă cu pulpa degetului, adăugându-se imediat o picătură de suspensie de drojdii. În final, aderenţa celulelor se realizează prin agitare în aer, care permite evaporarea apei (uscarea adezivului Haupt şi a celulelor).

B] Fixarea celulelor

Pentru fixarea celulelor de drojdii au fost adaptate metode utilizate în citologia clasică şi dezvoltate pentru această categorie de organisme. În continuare, vor fi prezentate câteva amestecuri fixatoare, utilizate în protocoalele complete de fixare şi colorare a nucleilor, cu largi aplicaţii în proiectele complexe de cercetare a celulelor de drojdii.

a. amestecul *acid-acetic – formaldehidă – alcool etilic*, se prepară din: 50 ml alcool etilic absolut (sau 50 ml etanol 70%), 5 ml acid acetic glacial, 5 ml formaldehidă. Timpul minim de fixare al celulelor cu acest amestec este de 45 min.;

b. fixatorul *Helly* modificat se obţine din: 5 g $HgCl_2$, 3 g bicromat de potasiu ce se dozolvă în 100 ml apă distilat; înainte de folosire se adaugă formaldehidă (până la 5%). Preparatul se fixează 10-20 min., se spală de mai multe ori cu alcool etilic 70% şi se păstrează lamele maxim 2 zile înainte de colorare;

c. fixatorul *Schaudin*, preparat din 20 ml soluţie saturată de $HgCl_2$, 10 ml etanol absolut, 30 ml apă distilată, 1 ml acid acetic glacial. Preparatul se fixează cu acest lichid 10 min. şi se spală cu alcool etilic 70%.

C] Colorarea nucleilor celulelor fixate

Colorarea nucleilor celulelor de drojdii se realizează, în principal, în scopul caracterizării evenimentelor care intervin în diviziunea nucleară, datele obţinute find completate cu o serie de analize genetice.

În prezent, sunt consacrate trei metode de colorare a nucleilor celulelor fixate de levuri, fiecare având anumite specificaţii: coloraţia cu *acid fucsinic* (pentru nucleol şi fusul mitotic de diviziune) şi coloraţia cu *HCl-Giemsa* sau *HCl-orceină acetică* (pentru cromosomi), ce permit investigarea substratului citologic al diviziunii mitotice şi meiotice la diferite specii de drojdii. Aceste metode sunt aplicabile pe celulele tratate cu oricare dintre amestecurile fixatoare menţionate.

a. *Colorarea cu acid fucsinic*

- ✓ se fixează celulele cu unul dintre fixatorii amintiţi, conform protocolului descris;
- ✓ se spală preparatele, în mai multe reprize, cu acid acetic 1%;
- ✓ se imersează lamelele în soluţia de acid fusinic, preparată în acid acetic 1% (1 : 40 000), timp de 1–5 min.;

BCU INSCENTRALA UNIVERSITY LIBRARY

✓ se scurge excesul de colorant, se adaugă o picătură de acid acetic 1%, se acoperă cu lamela şi se examinează microscopic, utilizând filtrul verde şi o iluminare optimă.

b. *Colorarea cu HCl – Giemsa*

✓ se fixează celulele cu unul dintre cei trei fixatori descrişi;

✓ se imersează lamele în NaCl 1%, la 60°C, 1 oră;

✓ se imersează lamelele, pentru hidroliză, în HCl 1M, la 60°C, 8–10 min. (sau în acid percloric 10%, la t° camerei, 24 ore);

✓ se spală preparatele cu apă de robinet, la 37°C;

✓ se colorează cu reactivul Giemsa–Gurr diluat în tampon fosfat Giemsa–Gurr, cu pH=6,8 (1 : 10), timp de 1–2 ore;

✓ se verifică calitatea coloraţiei cu obiectivele 40x sau 100x (imersie cu apă);

✓ în cazul preparatelor supracolorate, se realizează o diferenţiere, prin introducerea lamelor în apă acidulată (1 picătură de acid acetic glacial în 40 ml apă distilată), în plăci Petri. Timpul de diferenţiere se tatonează, pentru a obţine cele mai bune rezultate;

✓ se montează preparatele în soluţie Giemsa (2 picături de colorant Giemsa în 12 ml tampon Giemsa), se acoperă cu lamela şi se observă microscopic.

c. *Colorarea cu HCl – orceină acetică*

✓ se fixează celulele cu unul dintre cei trei fixatori;

✓ se hidrolizează cu HCl 1M la 60°C, 8–10 min.;

✓ se spală cu apă de robinet;

✓ se imersează în acid acetic 60% timp de câteva minute;

✓ se colorează preparatele, prin acoperire, cu orceină acetică (soluţie orceină 1% în acid acetic 60%), 20–30 min.;

✓ se acoperă preparatul colorat umed cu lamela şi se examinează microscopic.

BCU "ALEXANDRU IOAN CUZA" UNIVERSITY LIBRARY

1.3.2.Celule sangvine

1.3.2.1. Recoltarea sângelui

Recoltarea sângelui de la diferite animale de experienţă, fără sacrificarea acestora, se face în mod diferit, după specia animalului. Condiţiile de recoltare ţin seama de analizele necesare, care se pot face pe sânge integral (imediat sau după un timp), pe plasmă şi pe elemente figurate (recoltare pe anticoagulant). Pentru analize precise, recoltarea se face înainte de hrănire, la ore stabilite. Este indicat să se înlăture stresarea animalelor înainte de recoltarea sângelui, deoarece parametrii sangvini se pot modifica.

- La *nevertebrate* (moluşte, crustacee), hemolimfa poate fi recoltată din inimă sau pericard, cu un ac de seringă (de preferat seringă de insulină, gradată în sutimi de ml), având grijă ca la deschiderea pericardului să nu se amestece hemolimfa cu apă sau cu lichidele corpului (din intestin sau cavitatea generală). La scoici şi melci se sparge mai întâi o valvă sau cochilia în dreptul inimii, dezvelind pericardul.
- De la *peşti* se poate recolta sânge din vena codală, prin secţionarea cozii între înotătoarea anală şi cea codală. Se scoate peştele din apă, ţinându-se bine învelit, cu o bucată de pânză sau tifon, fără a-l strânge prea tare, i se îndepărtează toată apa din regiunea cozii prin tamponare cu tifon uscat, apoi cu o foarfecă sau un bisturiu i se secţionează total înotătoarea codală. Ţinând peştele vertical sau puţin înclinat, cu capul în sus, se recoltează sângele în eprubete (cu sau fără anticoagulant) cu picătura, masând corpul prin apăsarea uşoară a zonei inimii (lângă opercule). Se are grijă să nu cadă în eprubete conţinut intestinal sau apă, căci se produce hemoliza.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Pentru o mai bună separare a serului (la recoltare fără anticoagulant) sunt mai indicate eprubetele înguste, de hemoliză. După coagulare, la temperatura camerei (30-60min.), eprubetele se pot centrifuga uşor (3.000 rpm, 10 min.), iar serul separat în supernatant se poate extrage cu atenţie, fără agitare, cu o seriga gradată, de 1 ml, cu ac lung, sau cu o seringă de insulină, putându-se măsura astfel direct şi volumul serului (răsturnarea eprubetelor poate tulbura serul).

După această recoltare peştii mor, dar pot rămâne vii dacă se recoltează sânge prin puncţia venei caudale. După anestezie cu tricain metansulfonat (MS222 – Sandoz) 1:10.000, peştii se ţin cu branhiile în apă şi folosind o seringă cu anticoagulant, se introduce acul prin spinii hemali din zona medio-ventrală a înotătoarei codale, aspirând uşor, până când acul ajunge în canalul hemal (când sângele pătrunde în serigă).

- La *şobolan*, recoltarea sângelui se poate face din vena codală, din plexul retro-orbital, sau direct din inimă (cu ac şi seringă sterilă şi cu anticoagulant etalat pe pereţii seringii).

Pentru recoltarea din coadă, se ţine iniţial coada şobolanului, timp de 3-5 minute, în apă încălzită la 40°C, pentru dilatarea vaselor sangvine. Apoi se şterge bine coada cu pânză curată, îndepărtându-se total apa. Se tamponează apoi coada cu un tampon de vată îmbibat cu alcool sanitar pentru sterilizare, fără a rămâne picături. Cu un foarfece se retează brusc vârful cozii (circa 5 mm), se îndepărtează prima picătură de sânge (care poate hemoliza) şi apoi se recoltează sângele cu picătura, în eprubete sau pe o sticlă de ceas, masând uşor coada de la bază spre vârf, pe părţile laterale, unde se află venele codale. Se pot recolta aproximativ 0,5 ml sânge, cu sau fără anticoagulant.

Pentru recoltarea sângelui din plexul retro-orbital, animalele se anesteziază cu eter şi apoi cu vârful unei pipete Pasteur sterile, se străpunge ţesutul superficial

dintre globul ocular şi regiunea nazală, şi se lasă ca sângele să pătrundă în pipetă prin capilaritate. Înainte de recoltare, pereţii pipetelor sunt umeziţi cu anti-coagulant. Se pot recolta aproximativ 3 ml sânge.

Cantitatea totală de sânge la un şobolan este de 1/20 din greutatea corporală (ca şi la alte mamifere mici), deci de aproximativ 7-10ml la un animal de 150-200g greutate. După recoltare, animalele se lasă în repaus, se hrănesc şi se îngrijesc normal şi după 8-10 zile îşi refac cantitatea normală de sânge.

- La *iepure*, recoltarea sângelui se poate face din vena laterală externă a urechii, cu un ac de seringă sterilizat. Rezultate mai bune se obţin cu ace de la care s-a îndepărtat partea de racordare la seringă, în care sângele se poate coagula. Înainte de începerea recoltării, pentru vasodilataţie, urechea se încălzeşte uşor, folosind căldura becului unei lămpi de birou cu abajur sau se masează şi se tamponează cu vată îmbibată cu alcool sanitar.

Apoi se apleacă urechea cu vârful în jos, se comprimă vasele de la baza urechii cu degetele şi se penetrează vena laterală cu acul. Se decompresează urechea şi se masează uşor de la bază spre vârf, putându-se recolta 5-8 ml sânge. La sfârşit se pune un tampon de vată cu alcool sanitar pentru oprirea sângerării.

- Recoltarea de sânge de la *păsări* se poate face dintr-o venă subaxilară (vena ulnară), cu ace de seringă sterilizate, îndepărtând uşor aripa. Înainte de recoltare se tamponează locul cu alcool sanitar, iar la sfârşit se ţine câteva minute un tampon cu alcool sanitar apăsat uşor pe locul înţepăturii, deoarece se poate produce un hematom (acumularea de sânge sub piele).

- La *om* se poate recolta sânge capilar sau venos. Sângele capilar poate fi recoltat din pulpa degetului inelar sau mijlociu, cu ace Franke sau ace de injecţii subcutanate, sterilizate. Pentru probe speciale, se poate recolta sânge capilar din

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

lobul urechii. Se dezinfectează locul recoltării cu alcool sanitar sau eter, se lasă să se usuce şi se înţeapă pielea, rapid şi suficient de adânc.

Se şterge prima picătură, iar următoarele picături se recoltează fără a se stoarce, pentru a nu dilua sângele cu limfă, aplicându-se doar o uşoară presiune. Sângele venos poate fi recoltat cu ace de injecţie sterile, prin puncţia venei din zona cotului, după aplicarea garoului şi dezinfectarea pielii. După înţepare se lasă garoul liber şi se strânge uşor pumnul.

Pentru înlăturarea posibilităţi de infecţie, este necesar ca recoltarea sângelui de la om să se facă de către cadre calificate, utilizând instrumentar bine sterilizat (de preferinţă ace şi seringi de unică folosinţă).

Conservarea probelor de sânge total se poate face la 4°C, pentru câteva ore. Păstrarea la temperatura camerei determină perturbări în privinţa electroliţilor, enzimelor şi metaboliţilor sanguini.

Serul sau plasma se pot păstra la 4°C timp de 24 de ore, sau timp mai îndelungat dacă se congelează sau se liofilizează. Se pot utiliza şi conservanţi (timol-fluorură: 10mg fluorură de sodiu şi 1mg timol la 1ml sânge sau streptomicină 1mg/10ml sânge).

1.3.2.2. Anticoagulanţi

În anumite situaţii, în funcţie de analizele necesare, sângele se recoltează pe o substanţă anticoagulantă, care împiedică procesul de coagulare. Blocarea coagulării sângelui este necesară când se cere separarea elementelor figurate de plasma sangvină, sau pentru păstrarea sângelui în vederea unor analize care nu se pot realiza imediat: numărarea eritrocitelor şi leucocitelor, determinarea hemoglobinei şi a hematocritului sau stabilirea indicilor eritrocitari (valoarea

globulară, volumul eritrocitar mediu, indicele de sfericitate, suprafaţa eritrocitară medie etc).

Cei mai folosiţi anticoagulanţi sunt:

a. Heparina. Se foloseşte produsul farmaceutic din fiole, sub formă de soluţie apoasă, ce conţine heparină sodică (sau de potasiu, litiu ori amoniu), 5.000 u.i. (38,5mg/ml; 1mg heparinat corespunde la 100 unităţi internaţionale). Se utilizează de obicei 75unităţi/ml sânge, sau o picătură de heparină pentru 5ml sânge. Dacă se dizolvă 300mg heparinat de amoniu în 20 ml apă distilată se obţine o soluţie ce conţine 75unităţi în 0,05ml. Soluţia de heparină se etalează pe pereţii eprubetei sau flaconului în care se va recolta sângele, se evaporă apa (la 90-100^{0}C), apoi se recoltează sângele, agitând uşor flaconul, fără a face spumă, pentru dizolvarea heparinei în sânge. Heparina este un anticoagulant foarte bun, deoarece nu modifică parametrii fizico-chimici ai sângelui. La analize de ioni (sodiu, potasiu, litiu, amoniu) se va ţine seama de conţinutul ionic al soluţiei de heparină.

b. Oxalaţii (de sodiu, potasiu, litiu) blochează coagularea prin legarea calciului (factor de coagulare). Se utilizează de obicei 0,01ml soluţie oxalat pentru 1 ml de sânge.

Soluţia de oxalat se etalează pe pereţii eprubetei de recoltare şi se evaporă apa la cel mult 80^{0}C (temperaturile mai mari descompun oxalaţii). Oxalaţii nu sunt indicaţi pentru determinarea ionilor sau a unor enzime (LDH). De asemenea, oxalaţii produc pierderea apei din eritrocite, ceea ce determină crenelarea acestora, iar în concentraţii mai mari pot da hemoliză.

Oxalatul de sodiu 1,34% (0,1 M) se utilizează în mod curent în proporţie de 1 parte oxalat la 9 părţi sânge.

c. Citratul de sodiu (sau potasiu) se utilizează în concentraţie de 5mg/ml sânge, în special pentru determinarea fibrinogenului. Citratul trisodic 3,8% (cristalizat cu 2 molecule de apă) se utilizează de obicei în proporţie de 1 parte

citrat la 9 părţi sânge, sau pentru determinarea vitezei de sedimentare a hematiilor, 1 parte citrat la 4 părţi sânge. Prezintă aceleaşi dezavantaje ca şi oxalaţii.

d. Fluorura de sodiu (sau potasiu) inhibă coagularea prin legarea calciului. Se utilizează în doză de10mg fluorură/1ml sânge. Se recomandă utilizarea sa în determinarea unor electroliţi.

e. EDTA (etilendiaminotetraacetat de sodiu, complexon III) soluţie 1% (sau 10%) în ser fiziologic (NaCl0,9%). Se repartizează câte 0,2ml în flacoane de recoltare a sângelui, se etalează pe pereţii lor şi se usucă. Se recoltează 2ml sânge (proporţia 1:10). Se indică utilizarea a 1mg EDTA sodic/ml sânge. EDTA păstrează mai bine morfologia celulelor sangvine comparativ cu alţi anticoagulanţi, dar nu se recomandă pentru determinarea calciului, a altor ioni şi a azotului rezidual. Poate modifca activitatea unor enzime (fosfataza acidă şi alcalină).

f. Anticoagulantul Wintrobe. Conţine oxalat de amoniu 1,2g, oxalat de potasiu 0,8g şi apă distilată până la 100ml (în balon cotat). Se utilizează în proporţie de 1ml antocoagulant la 10ml sânge. Se introduc câte 0,5ml din acest amestec în eprubetele de recoltare, se etalează pe pereţii lor şi se lasă să se usuce la temperatura camerei sau la termostat, la 37°C (temperaturile înalte descompun substanţa). La recoltarea sângelui se agită uşor, fără să se facă spumă, apoi se astupă cu dop de cauciuc curat şi uscat.

1.3.2.3. Numărarea eritrocitelor

Principiu: Evaluarea numărului celulelor din lichidele biologice constă în numărarea directă, la microscop, a celulelor care se găsesc într-un volum cunoscut de lichid, diluat într-o proporţie cunoscută. Principiul este comun tuturor tipurilor de celule sangvine.

Sângele se diluează, pentru a putea număra elementele figurate, care sunt foarte numeroase într-un volum de sânge şi pentru evitarea coagulării. Diluarea se face cu o soluţie izotonică pentru elementele care se numără, cu proprietăţi litice, pentru celelalte tipuri de celule.

Numărarea se face într-un volum cunoscut de lichid, în camere speciale caroiate, numite *hemocitometre* (de tip Bürker-Türk, Thoma-Zeiss, Goreaev etc.) şi se calculează numărul celulelor pe mm^3, sau pe µl, ţinând seama de diluţie.

Se poate realiza şi o numărare automată, utilizând un dispozitiv numit celoscop, al cărui principiu se bazează pe rezistenţa electrică a celulelor.

Materiale necesare: lichid de diluţie, pipete pentru diluţie (de tip Potain), cameră de numărare (hemocitometru), lamele de sticlă, ace pentru puncţie, alcool, spirt sanitar, eter, vată.

- *Lichide de diluţie:* soluţie Hayem, soluţie Withby sau ser fiziologic pentru eritrocite; soluţie Türk pentru leucocite; soluţie Poppa-Enache-Nicoară pentru trombocite.

Soluţie Hayem (pentru eritrocite):

- NaCl 1g
- Na_2SO_4 ..... 5 g
- $HgCl_2$ (sublimat)..... 0,5 g
- apă distilată ..... la 200 ml

Se filtrează prin hârtie de filtru.

Soluţie Withby (pentru eritrocite):

- NaCl ..... 0,6 g
- Citrat de Na ..... 1 g
- Formol 40% ..... 1 ml
- apă distilată..... 99 ml

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Soluţie Türk (pentru leucocite):

- acid acetic glacial..... 1 ml
- albastru de metilen 1 % ..... 1- 2 picături
- apă distilată ..... 100 ml

Soluţie-Poppa-Enache-Nicoară (pentru trombocite):

- oxalat de amoniu ..... 1 g
- EDTA-Na_2..... 0,010 g
- apă distilată ..... 100 ml

• *Pipetele de diluţie Potain* sunt de două categorii: cu *bilă roşie* (pentru eritrocite), cu diviziunea maximă 101 şi cu *bilă albă* (pentru leucocite şi trombocite) şi diviziunea maximă 11 (**Fig. 18**).

Pipetele trebuie să fie neciobite, curate şi perfect uscate. După întrebuinţare se spală cu apă de robinet şi cu apă distilată (sau, la nevoie, cu amestec sulfocromic şi apoi cu apă de robinet şi distilată) şi se usucă (în pupinel, la temperatură joasă, ori cu aer cald). Pentru uscare rapidă, se pot spăla în final cu alcool concentrat şi apoi cu eter. Pipetele au un tub de cauciuc ataşat, pentru aspirarea lichidului de diluţie.

• *Camera de numărare şi lamela* cu care se acoperă aceasta trebuie, de asemenea, să fie curate şi uscate.

Toate tipurile de camere de numărătoare au gravate, anumite date:

- înălţimea camerei, de 0,100 mm (1/10 mm);
- două cifre (fracţii): 1/400 şi 1/25 sau 1/400 şi 1/16 (în funcţie de tipul camerei) care indică a câta parte dintr-un milimetru pătrat reprezintă un pătrăţel mic şi respectiv, un pătrăţel mare (fără subdiviziuni).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

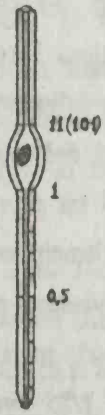


Fig. 18. Pipeta Potain

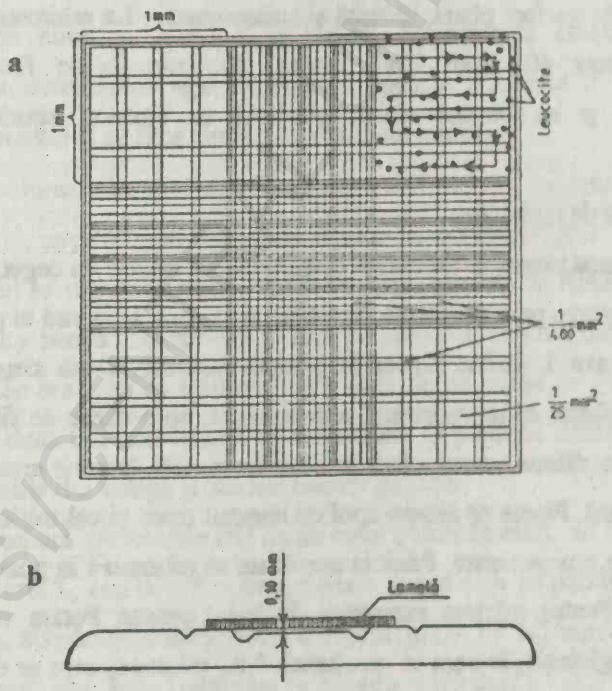


Fig. 19. Camera Bürker-Türk: a – caroiajul văzut de faţă; b- profilul camerei (după Kondi, 1981)

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

✓ Camera Bürker-Türck (Fig. 19) este cea mai des folosită. Are o suprafaţă de 9 mm^2 şi o reţea gravată după tipul Türck, combinat cu tipul Thoma. Suprafaţa totală a caroiajului, de 9mm, este delimitată prin linii triple şi este împărţită, tot prin linii triple, în 9 pătrate mari de1 mm^2. Pătratul din mijloc de1 mm^2 este împărţit în 400 de pătrăţele mici cu suprafaţa de 1/400 dintr-un mm^2 care se folosesc pentru numărătoarea eritrocitelor. Pătratele mari, exterioare faţă de pătratul caroiat din mijloc, se folosesc pentru numărarea leucocitelor şi sunt împărţite, fiecare, în câte 16 pătrăţele mari, separate prin linii duble. Un astfel de pătrăţel mare are o suprafaţă de 1/25 dintr-un milimetru pătrat, deci egală cu suprafaţa a 16 pătrăţele mici de 1/400mm^2.

✓ Lamela pentru acoperirea camerei trebuie să aibă o anumită grosime (0,3-0,5 mm) şi să fie perfect plană, şlefuită şi transparentă . La microscop se lucrează cu obiectiv uscat 40x (sau 20x), ocular 10x (sau 7x în funcţie de tipul microscopului) şi cu lumină slabă, potrivită cu ajutorul condensatorului şi diafragmei.

Tehnica de numărare:

- Recoltarea sângelui. Se curăţă bine cu alcool sanitar un deget, se înţeapă cu un ac steril, se şterge prima picătură de sânge, iar a doua se aspiră în pipetă, până la diviziunea 0,5 sau 1, ţinând pipeta în poziţie verticală. Dacă sângele depăşeşte diviziunea, surplusul se îndepărtează prin atingere, cu o hârtie de filtru. Se aspiră apoi lichidul de diluţie, exact până la diviziunea 101 (pentru eritrocite) sau 11 (pentru leucocite). Pipeta se astupă apoi cu degetul mare şi cel mijlociu şi se agită puternic, pentru omogenizare. Până la numărare se păstrează în poziţie orizontală, pe un suport. Pentru mărirea exactităţii, în locul pipetei Potain se poate folosi pipeta de hemoglobină, în care se recoltează 0,02 mlsânge, care se diluează 1/200 într-o eprubetă ce conţine 4 ml din soluţia: formol - 1 ml, citrat de sodiu 3 % - 99 ml.

- Umplerea camerei de numărat. Se aplică lamela deasupra camerei de numărat, prin adeziune (umezind puţin marginile mai ridicate de pe laturile caroiajului) sau cu ajutorul cavalerilor, astfel încât să se realizeze o bună aderenţă între lamă şi lamelă. Aceasta se atinge în momentul în care se formează inele colorate de refracţie (inelele Newton).

Pipeta cu sângele diluat se agită 1-2min. şi apoi se varsă 2-3 picături, pentru golirea capilarului ce conţine numai lichid de diluţie. Apoi se apropie vârful pipetei de joncţiunea dintre lamelă şi lamă şi se lasă să pătrundă sânge diluat, prin capilaritate, în spaţiul caroiat dintre lamelă şi lamă, cu grosimea de 1/10 mm. Se are grijă ca spaţiul caroiat să fie umplut în întregime, fără bule de aer, iar lichidul să nu treacă în şanţurile laterale. În caz contrar, lama şi lamela se şterg cu hârtie de filtru şi tifon curat şi operaţia se repetă. Se aşteaptă câteva minute pentru sedimentarea elementelor figurate (1-2min. pentru eritrocite şi leucocite, 15min. pentru trombocite) şi se face numărătoarea la microscop.

- Numărarea eritrocitelor. Se examinează camera la microscop, iniţial cu obiectivul 20x, apoi 40x, în lumină potrivită, cu condensatorul ridicat. În câmpul microscopului se văd numeroase eritrocite mici, leucocitele fiind lizate de lichidul de diluţie. Numărarea eritrocitelor se face pe caroiajul central, cu pătrăţele mici, de 1/400 mm^2. Se are grijă ca elementele figurate de pe liniile de delimitare să nu fie numărate de două ori, numărându-se numai cele de pe două laturi, de exemplu cele aşezate pe liniile din stânga şi sus ale fiecare pătrăţel.

Se numără eritrocitele (N) de pe cinci pătrăţele mari, de 1/25 mm^2, dispuse sub forma literei L, sau la întâmplare, fiecare având câte 16 pătrăţele mici de 1/400 mm^2. În total 80 pătrăţele mici, adică o suprafaţă (S) de 1/5 mm^2 (5 x 1/25 mm^2 = 5/25 = 1/5 mm^2, sau: 80 x 1/400 mm^2 = 80/400 = 1/5 mm^2).

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Numărul total de eritrocite (nr./mm^3 sau µl), se calculează ţinând seama de diluţie (D) şi înălţimea camerei (I):

$$nr/mm^3 = N \times S \times D \times I$$

Exemplu: dacă în 80 pătrăţele de 1/400 mm^2 se numără 450 eritrocite (N), pe 1 mm^2 (adică pe 400 pătrăţele mici) se găsesc:

$$n = \frac{450 \times 400}{80} = 450 \times 5.$$

n se înmulţeşte cu diluţia (200 sau 100x) şi cu înălţimea camerei (10).

Se poate calcula şi direct:

$$nr/mm^3 = 450 \times 5 \times 200 \times 10 = 450 \times 10.000 = 4.500.000$$

✓ Simplificat, calculul se poate face astfel: dacă diluţia este 1/200 (sânge până la diviziunea 0,5 a pipetei) şi înălţimea este de 1/10, atunci 450 x 5 se înmulţeşte cu 200 x 10 = 2.000. Rezultă: nr./mm^3 = 450 x 5 x 2.000 = 4.500.000.

O variantă simplificată: la diluţia 1/200, numărul de eritrocite găsit pe 80 pătrăţele mici se înmulţeşte cu 10.000 şi se află nr. de eritrocite pe 1 mm^3. La diluţia 1/100 (sânge în pipetă până la diviziunea 1), nr. de eritrocite de pe 80 de pătrăţele se înmulţeşte cu 5.000. Pentru mărirea exactităţii, se fac două numărători diferite ale probei de sânge.

Erori: Pot exista pipete şi camere etalonate greşit, sau cu neregularităţi de suprafaţă. De asemenea, pot apărea erori şi prin: sticlărie nespălată corect şi neuscată, recoltare greşită a sângelui, hemoliză, coagulare, umplerea incorectă a pipetei şi camerei, evaporare, neagitarea pipetei la umplerea camerei, numărare greşită etc.

Erorile admise sunt de 100.000 - 200.000 între două numărări la aceeaşi probă de sânge.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Valori normale (la om): bărbat 4.500.000 - 5.000.000; femeie 4.200.000 - 4.500.000; nou-născut 5.000.000 - 6.000.000 (eritrocite/mm^3 sau µl).

1.3.2.4. Numărarea leucocitelor

Principiu: Sângele proaspăt (sau cu anticoagulant uscat) se aspiră în pipeta Potain cu bilă albă, până la diviziunea 0,5, apoi se diluează cu soluţie Türk, până la diviziunea 11 a pipetei. Soluţia Türk lizează eritrocitele (anucleate), păstrând numai elementele nucleate (leucocite şi eritroblaşti). Umplerea camerei se face ca în cazul eritrocitelor.

Material necesar: materiale pentru recoltarea sângelui, Pipetă Potain, cameră de numărat (Bürker - Türk, Goreaev, Bürker), microscop.

Pipeta Potain pentru leucocite este un tub capilar cu 10 gradaţii şi o bulă de diluţie, în care este o bilă albă pentru agitare. Gradaţiile sunt: 0,5; 1; 11. Sângele se recoltează până la 0,5 sau 1 şi se diluează până la 11. Dacă se recoltează până la 0,5 diluţia este de 1/20, iar la 1 diluţia este de 1/10. Capacitatea totală a pipetei este de 11 volume, căci un volum de soluţie diluantă rămâne în capilar şi nu diluează sângele.

Tehnica de lucru: Recoltarea şi umplerea camerei se realizează la fel ca pentru eritrocite.

Numărarea se face pe caroiajul cu pătrăţele mari, de 1/25 mm^2, al camerei. Se numără 5 câmpuri caroiate de câte 1 mm^2 fiecare (4 de pe o parte a şanţului central şi unul de pe partea opusă), în total 25 pătrăţele de 1/25 mm^2 (adică 5 mm^2). Se calculează apoi numărul de leucocite pe mm^3 de sânge.

Exemplu: dacă pe 5 mm^2 se găsesc 160 leucocite, atunci pe 1 mm^3 sunt 32 leucocite (160 : 5 = 32). La recoltarea sângelui până la diviziunea 0,5, diluţia este 1/20, iar numărul total de leucocite pe mm^3 este:

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

$$nr/mm^3 = N \times D \times I$$

- N = nr. pe 1 mm^2 (32);
- D = diluţia (1/20);
- I = înălţimea camerei (1/10).

Deci:

$$nr./mm^3 = 32 \times 20 \times 10 = 32 \times 200 = 6.400 \text{ leucocite.}$$

La recoltarea sângelui până la diviziunea 1 (diluţia 1/10), rezultă:

$$nr/mm^3 = N \times D \times I = 64 \times 100 = 6.400 \text{ leucocite.}$$

Alte procedee de calcul

✓ După **Ţiţeica şi Halunga-Marinescu,** calculul se poate face astfel: se numără 4 câmpuri de 1 mm^2 (cele 4 colţuri ale camerei), adică 4 mm^2. Atunci:

$nr./mm^3 = N \times D \times I$, adică:

nr/mm^3 = nr. leucocite numărate pe 4 mm^2 x 1/4 x 10 x 20, sau

nr/mm^3 = nr. leucocite numărate x 50

✓ Conform unui procedeu rapid, aplicat în laboratoarele clinice, se procedează astfel: se numără leucocitele de pe două caroiaje de 1 mm^2 (2 mm^2 = 32 pătrate de 1/25 mm^2), de pe jumătatea stângă a camerei, iar numărul total găsit pe cele două pătrate mari se înmulţeşte cu 100.

Exemplu: dacă pe 2 mm^2 se găsesc 64 leucocite (32/mm^2), atunci:

nr/mm^3 = 64 x 100 = 6.400 leucocite.

Se procedează similar şi pentru partea dreaptă a camerei şi se face media celor două determinări.

Observaţie: dacă în camera de numărare apar eritroblaste (celule roşii tinere, nucleate), care nu sunt lizate de soluţia Türk, acestea se numără împreună cu leucocitele. Pentru aflarea numărului real de leucocite, se face diferenţa dintre numărul total de celule nucleate (leucocite + eritroblaste = kariocite, K) şi numărul

BCU "CAROL I" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

absolut de eritroblaste (E) observate pe frotiu. Se aplică regula de trei simplă la procentul de eritroblaste urmărite pe frotiu, faţă de leucocite.

Exemplu: K = 24.000/mm^3; E = 20% (20 la 100 leucocite). Dacă:

la 120 K (100 leucocite + 20 eritroblaste) .....20 E

la 24.000 K.....24.000 x 20/120 = 4.000 E

Deci:

nr. leucocite/mm^3 = 24.000 K - 4.000 E = 20.000

Erori pot apare din aceleaşi motive ca şi la eritrocite.

Valori normale (la om): adult = 5.000 - 9.000/mm^3; sugar = 8.000 - 12.000/mm^3; nou-născut = 12.000 - 20.000/ mm^3

Variaţii fiziologice (la om): hiperleucocitoză (creşterea numărului de leucocite) - după mese abundente, după efort muscular intens, la femei gravide; leucopenie (scăderea numărului de leucocite) – în caz de intoleranţă faţă de unele alimente; la copii (de la nou-născut până la la vârsta de 5-7 ani, când se ajunge la numărul de la adult). Se poate vorbi de leucopenie patologică odată cu scăderea numărului de leucocite sub 3.000/mm^3. Unele leucopenii sunt congenitale, iar altele sunt spontane şi nu implică modificarea stării fiziologice.

Valori normale la alte specii: la iepure – eritrocite = 4 - 6,4 milioane/mm^3, leucocite = 8.000/mm^3; la şobolan – eritrocite = 8 milioane/mm^3, leucocite = 12.000/mm^3.

1.3.2.5. Numărarea trombocitelor

A] Metoda indirectă Fonio

Principiu: Pe un frotiu colorat se numără trombocitele şi se stabileşte procentajul lor faţă de eritrocite, iar apoi, prin raportare la numărul de eritrocite/mm^3, se află numărul de trombocite/mm^3 (metodă indirectă).

B.C.U. „M. EMINESCU" IAŞI

Material şi reactivi: material pentru recoltarea sângelui, soluţie de sulfat de magneziu 14g %, reactivi pentru coloraţia panoptică May-Grünwald-Giemsa.

Tehnica de lucru:

Se înţeapă pulpa degetului şi pe locul înţepăturii se pune o picătură de sulfat de magneziu 14 %. Se apasă uşor până iese o picătură de sânge direct în picătura de sulfat de magneziu. Se amestecă cele două picături cu colţul unei lame şi, după omogenizare, se întind frotiuri subţiri, care se colorează prin metoda May-Grünwald-Giemsa, prelungită la 40-50min. Sulfatul de magneziu se utilizează pentru înlăturarea aglutinării spontane a trombocitelor.

Numărarea. Pe frotiurile colorate se numără trombocitele întâlnite la 1.000 eritrocite şi apoi, cunoscând numărul de eritrocite/mm^3, prin regula de trei simplă, se află numărul de trombocite/mm^3. Trombocitele se recunosc pe frotiu, fiind cele mai mici elemente (2-5 μm), cu o zonă centrală colorată în violet (cromomerul) şi o zonă periferică, uşor azurofilă (hialomerul) şi cu marginile angulare, uşor neregulate. Au tendinţa de a se aglutina în grupuri, printre eritrocite.

Exemplu: Dacă la 1.000 eritrocite se numără 40 trombocite, iar numărul total de eritrocite este de 4.000.000/mm^3, numărul de trombocite este de 160.000/mm^3 (prin regula de trei simplă):

$$n = 40 \times 4.000.000/1.000 = 160.000$$

Observaţie: Pentru uşurarea numărătorii, pe diafragmul ocularului microscopului se aplică o rondelă de hârtie cu o fereastră mică, tăiată sub formă de pătrăţel, în vederea limitării câmpului microscopic.

Valori normale (la om): 130.000 - 300.000 trombocite/mm^3.

BCU IAŞI CENTRALA UNIVERSITARĂ LIBRARY

B] Metode directe

a. Numărarea trombocitelor prin sedimentare spontană

Într-o pipetă Potain pentru leucocite se aspiră sânge proaspăt, sau cu anticoagulant uscat, până la diviziunea 1. Apoi se aspiră în pipetă o soluţie de citrat trisodic 3,8 %, până la diviziunea 11, realizându-se astfel o diluţie a sângelui de 1/10. Se omogenizează şi apoi se aruncă 2 picături din soluţia de citrat din capilarul pipetei, iar restul conţinutului pipetei se trece într-o eprubetă cu diametru mic, de 5 mm. Eprubeta se lasă în poziţie verticală 1-2 ore, sau se centrifughează uşor, 1min. la 1.000 rpm.

Eritrocitele sedimentează uşor, iar la partea superioară a eprubetei rămâne o coloană mică de lichid alb, transparent. Cu o pipetă Pasteur se ia o picătură din supernatant şi se umple camera de numărare. Se lasă 15-20 minute pentru sedimentare şi apoi se numără trombocitele de pe 1 mm^2. Metoda este rapidă şi permite să se obţină o suspensie de trombocite aproape lipsită de eritrocite.

Numărul de trombocite pe 1mm^3 se înmulţeşte cu 10 (diluţia sângelui) şi se află numărul de trombocite pe 1mm^3 de sânge.

Valori normale (la om): 150.000-300.000/mm^3.

b. Metoda Christensen de numărare simultană a trombocitelor şi leucocitelor

Reactivi:

Soluţia I:

- albastru briliant de crezil .....0,20 g
- citrat de sodiu..... 1 g
- sublimat (Cl_2Hg) ..... 2 mg
- apă distilată..... 100 ml

Soluţia II:

- uree .....20 g

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- apă distilată până la..... 100 ml

Soluţiile I şi II se filtrează şi se păstrează separat la frigider. Dacă apar precipitate, nu se mai folosesc. Înainte de folosire se amestecă 3 părţi soluţie I cu 4 părţi soluţie II. Amestecul poate fi folosit câteva zile.

În pipeta de leucocite se face diluţia sângelui cu amestecul de soluţii I + II, se agită, se lasă 10 min. în repaus, iar apoi se numără concomitent leucocitele şi trombocitele în camera Bürker- Türk şi se calculează numărul/mm^3.

1.3.2.6. Frotiul sangvin

Etalarea materialului biologic în monostrat se poate realiza prin tehnicile *frotiului* şi *amprentelor de organe*.

Frotiul se realizează prin întinderea celulelor în monostrat pe lame de sticlă, în vederea examinării la microscop. Astfel, pot fi examinate celulele sangvine (periferice şi medulare), celule epiteliale descuamate sau exfoliate (din piele, cavitatea bucală, farige, căi respiratorii extra - şi intrapulmonare, vagin, col uterin, endometru, căi galactofore, lichid cefalo-rahidian, lichid pleural, lichid de ascită precum şi amprentele de organe). Această metodă este foarte utilă în citologie, biologie celulară şi pentru precizarea diagnosticului în practica medicală.

a. Tehnica frotiului de sânge

Principiu: se întinde o picătură de sânge proaspăt recoltat pe o lamă de sticlă (portobiect) în strat subţire, astfel ca elementele figurate (celulele sangvine) să nu fie suprapuse; în final se colorează şi se studiază la microscop.

Tehnică de lucru:

Se şterge locul recoltării sângelui cu alcool sau eter, se face înţepătura (la om cu un ac pentru injecţii sterilizat) şi se îndepărtează prima picătură de sânge (deoarece conţine impurităţi de pe piele şi lichid interstiţial).

Cu colţul unei lame de sticlă şlefuite se ia o picătură mică de sânge şi lama cu picătura se aplică sub un unghi de 30^0 pe o altă lamă de sticlă curată şi degrasată, aşezată orizontal, astfel ca sângele să se întindă prin capilaritate la marginea de contact dintre lame, făcând o mişcare laterală uşoară a lamei. Apoi se imprimă lamei şlefuite o mişcare de translaţie în lungul lamei portobiect, realizându-se întinderea sângelui pe lungimea lamei (**Fig. 20**).

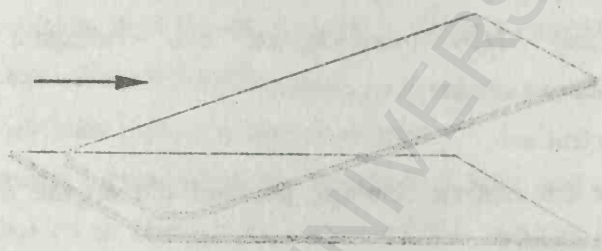


Fig.20. Realizarea frotiului

După întinderea frotiului, lama se agită pentru uscare în aer. Se are grijă ca pe lama cu frotiu să rămână două margini libere pentru o bună citire la microscop, deoarece leucocitele au tendinţa de a migra pe marginile frotiului, existând pericolul de a ajunge pe marginea laterală a lamei, unde nu pot fi studiate. Frotiul se întinde în strat subţire, pentru ca elementele să nu fie suprapuse. Calitatea frotiului depinde de:

- ✓ mărimea picăturii de sânge (picătură mică - frotiu subţire);
- ✓ unghiul dintre cele două lame să fie de $30\text{-}35^0$ (unghi mic - frotiu subţire; unghi mare - frotiu gros);
- ✓ viteza de întindere (viteză mică - frotiu subţire).

Fixarea frotiului se poate face prin uscare, sau cu soluţii fixatoare. Uscarea (desicarea) în aer trebuie să fie rapidă şi se obţine prin agitarea lamei. Uscarea lentă duce la ratatinarea (zbârcirea) celulelor.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Soluţii fixatoare (frotiu umed): alcool etilic absolut timp de 15 minute, alcool etilic absolut şi eter în părţi egale (5-15 min.), alcool metilic (2 min.), vapori de OsO_4 soluţie 2%.

După fixare se trece la *colorarea frotiului*.

Colorarea trebuie făcută cât mai curând după realizarea frotiului, deoarece altfel celulele se alterează, pierzându-şi afinitatea tinctorială.

Pentru studierea morfologiei celulelor sangvine se realizează coloraţia dublă (panoptică) May-Grünwald-Giemsa, care evidenţiază caracteristicile compoziţiei chimice a substanţei vii celulare.

b. Alte frotiuri

- **Frotiul din material biologic provenit din organe care prezintă o descuamare fiziologică**

Astfel de frotiuri se pot realiza din secreţii bronşice, mamare, vaginale, prostatice ori din celule provenite din descuamarea epiteliilor mucoasei bucale, nazale sau oculare.

Recoltarea acestor materiale se face cu o spatulă din sticlă sau metal, ori folosind tampoane sterile de vată sau tifon, iar materialul recoltat se etalează în strat subţire pe lame de sticlă degresate.

După realizarea frotiului, lamele proaspete, înainte de uscare, se fixează într-un amestec de alcool etilic absolut şi eter în părţi egale, 15 min. Se pot folosi şi alte amestecuri fixatoare, în raport de scopul urmărit. După fixare se realizează colorarea.

- **Frotiul din materiale biologice provenite din puncţii**

Materialele biologice provin din puncţii pleurale, ganglionare şi peritoneale (în caz de pleurezie, ascită) sau din spălături gastrice.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Materialul recoltat se prelucrează imediat sau se fixează în alcool etilic 50%, iar materialul obţinut din aspiratul gastric se fixează în alcool etilic 95%.

Produsele fixate sau refixate se centrifughează la 1500-4000rpm, 10-30 min. Apoi se îndepărtează lichidul supernatant, iar din sediment se ia, cu o ansă, o picătură care se etalează pe o lamă de sticlă pe care s-a întins un strat subţire de albumină Mayer. Frotiurile umede se fixează 15 min. într-o baie de alcool absolut-eter în părţi egale (chiar dacă lichidul biologic a fost fixat iniţial cu alcool etilic 50%). Urmează apoi colorarea frotiului.

- **Frotiuri obţinute prin amprente de organe**

Se secţionează transversal organul examinat, în zona care prezintă interes. Secţionarea se face cu un bisturiu sau cu o lamă bine ascuţită, pentru evitarea deformării ţesuturilor.

Se prinde cu o pensă un fragment secţionat şi se apasă uşor cu faţa secţionată pe o lamă de sticlă degresată. Se fixează cu alcool etilic absolut-eter în părţi egale, 15 min. Se colorează.

- **Colorarea frotiurilor din sedimente celulare şi amprente de organe**

Frotiurile realizate din celule epiteliale descuamate sau exfoliate (din cavitatea bucală, uretră, vagin, prostată), din sedimente celulare (suc gastric, bilă, lichid cefalorahidian, lichid pleural, lichid ascitic, urină), precum şi amprentele de organe se pot colora prin metoda May-Grunwald-Giemsa sau cu hemalaun-eozină.

1.3.2.7. Metode de colorare

A] Coloraţia panoptică May-Grünwald-Giemsa

Este o coloraţie utilizată frecvent în hematologie, permiţând colorarea tuturor elementelor figurate sangvine. Metoda oferă şi indicaţii asupra pH-ului componentelor celulare întrucât utilizează coloranţi acizi (eozină), bazici (azur de

metilen, albastru de metilen) şi neutri (eozinat de albastru de metilen, eozinat de azur de metilen).

Astfel, eozina (acidă) este fixată de granulaţiile eozinofile celulare, care sunt alcaline (pH=11); albastrul de metilen (bazic) este fixat de ARN din citoplasma eritroblastelor (colorându-se în albastru), precum şi din nucleol, iar azurul de metilen (bazic) este fixat de ADN din nucleu.

De obicei, citoplasma este bazofilă datorită concentraţiei mari de ARN, reacţia fiind mai puternică la celulele tinere şi tot mai slabă, pe măsura maturării lor, odată cu scăderea concentraţiei de ARN.

Reactivi:

- soluţia May-Grünwald conţine:

- eozinat de albastru de metilen ..... 1 g
- glicerină neutră p.a. ..... 50 ml
- alcool metilic p.a. ..... 100 ml

La utilizare se diluează: 1-4 picături la 1 ml apă distilată

- soluţia Giemsa conţine:

- eozinat de azur de metilen ..... 3 g
- azur de metilen..... 0,8 g
- glicerină neutră p.a. ..... 250 ml
- alcool metilic ..... 200 ml

Aceste două soluţii se pot procura şi gata preparate.

- apă distilată tamponată, cu pH = 7,2; 7 sau 6,8.

Apa distilată este de obicei acidă. Pentru neutralizare se adaugă câteva picături de soluţie slabă de carbonat de sodiu 1%, la 500 ml apă distilată. Pentru celulele sangvine se foloseşte apa distilată neutră (pH=7) sau uşor acidă (pH=6,8),

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

obţinută cu tampon fosfat, care dă rezultate mai bune. Tamponul cu pH=6,8 se obţine din:

- soluţia I: KH_2PO_4 M/15.....0,90 g%
- soluţia II: Na_2HPO_4 M/15 ..... 1,18 g%

Se amestecă soluţiile I şi II în părţi egale şi se foloseşte 1 parte tampon la 9 părţi apă distilată. La utilizarea apei se controlează şi se corectează pH-ul .

Pentru agentul malariei (*Plasmodium falciparum)*, se foloseşte apă distilată cu pH=7,2 obţinută cu tampon fosfat:

- KH_2PO_4.....0,49 g
- Na_2HPO_4.....1,14 g
- apă distilată .....200 ml

Se foloseşte 1 parte tampon la 9 părţi apă distilată..

Tehnică de lucru:

Se utilizează frotiuri proaspete. Tehnica se desfăşoară în trei etape.

Fixarea. Se aşează lamela cu frotiul pe două baghete de sticlă, deasupra unei tăvi şi se acoperă cu 8-10 picături de soluţie May-Grünwald (care, nediluată, are rol de fixator), 1-3 min. Pentru fixare se poate folosi şi alcoolul metilic (3-5 min.) sau alcool etilic (15 min.).

Colorarea. Peste soluţia May-Grünwald se adaugă pe lame, un număr de picături de apă distilată (neutră sau cu pH=6,8) egal cu cel al soluţiei May-Grünwald. Se înclină uşor lamele, pentru amestecul lichidelor şi se lasă 1-2 min. (soluţia May- Grünwald diluată devine colorant).

Se varsă soluţia May-Grünwald de pe lame, şi fără să se spele, acestea se acoperă cu soluţie Giemsa diluată extemporaneu (1-4 picături la 1ml apă distilată, după calitatea colorantului). Se lasă în repaus 20-30 min.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Spălarea. Se spală abundent cu apă de robinet, sub jet, se şterge dosul lamelor şi se lasă lamele să se usuce, în poziţie verticală, pe un stativ de lemn cu crestături.

Notă: Pentru colorarea trombocitelor se procedează la fel, dar timpul de colorare cu Giemsa este mai lung (45 de min.), iar spălarea cu apă curentă se face uşor, fără jet, pentru a nu antrena trombocitele.

Rezultat: O coloraţie reuşită este condiţionată de calitatea şi concentraţia colorantului, timpul de colorare şi pH-ul apei. Într-o coloraţie reuşită hematiile apar colorate roz-roşietic (**TABEL IV**). Corectarea pH-ului se poate face prin fierberea apei, cu Na_2CO_3 1%, sau se foloseşte apa tamponată cu tampon fosfat.

Soluţia May-Grünwald colorează bine citoplasma granulocitelor şi granulaţiile lor, soluţia Giemsa colorează evident nucleul şi granulaţiile azurofile, precum şi paraziţii.

Observaţii: Pot apare coloraţii nereuşite, astfel:

- ✓ frotiu colorat roz-roşietic. Cauza: pH acid datorită apei distilate, colorantului sau spălării prelungite cu apă acidă. Se corectează pH-ul;
- ✓ frotiu albastru. Cauze: pH alcalin (datorat apei distilate sau colorantului), supracolorarea lamei, spălarea insuficientă, frotiul prea gros;
- ✓ frotiu cu precipitat. Cauze: uscarea frotiului în timpul colorării, spălare insufieintă, sedimentarea colorantului în sticlă (trebuie filtrat);
- ✓ frotiu supracolorat. Se poate decolora cu alcool metilic;
- ✓ frotiu slab colorat. Se recolorează cu soluţie Giemsa;
- ✓ hematiile apar albastre. Apa este alcalină;
- ✓ hematii colorate în roşu-aprins. Apa este acidă.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

TABEL IV Rezultatul colorării panoptice (Kondi, 1981)

Celule şi structuri	Soluţie May-Grünwald	Soluţie Giemsa	Coloraţie
Hematii	Colorează	Colorează	Roz-roşietic
Granulocite:			
- Neutrofile	Colorează	nu colorează	Brun
- Eozinofile	Colorează	colorează	Portocaliu
- Bazofile	Colorează	colorează	Albastru închis- negru
Nucleul	nu colorează	Colorează	Violaceu
Citoplasma:			
- Limfocite	Colorează	Colorează	Albastră
- Monocite	Colorează	Colorează	Albastră
Granulaţii azurofile	nu colorează	Colorează	Roşu-violet
Hematozoar (parazit)	nu colorează	Colorează	Roşu-violet

B] Coloraţii Giemsa rapide

a. Metoda Virgil Ionescu

Se foloseşte un amestec colorant panoptic, preparat din substanţe în stare de pulbere (**Kondi, 1981**):

- May-Grünwald (pulbere) ..... 1 g
- Giemsa (pulbere) ..... 2 g
- alcool metilic p.a. până la 1.000 ml

Se poate folosi şi un amestec lichid format din două părţi alcool metilic absolut şi o parte colorant Giemsa nediluat.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tehnica de lucru:

- ✓ se acoperă frotiul cu amestec panoptic şi se lasă 2-3 min.;
- ✓ se adaugă peste amestec apă tamponată neutră în cantitate dublă faţă de amestec (număr dublu de picături). Se omogenizează şi se lasă 10-15 min.;
- ✓ se spală cu jet de apă de robinet, se şterge dosul lamelor şi se lasă la uscat la aer.

b. Metoda Ţiţeica, Halunga-Marinescu

Se foloseşte un amestec colorant format din 2 părţi alcool etilic absolut şi 1 parte soluţie Giemsa nediluată.

Tehnica de lucru:

- ✓ se acoperă frotiul cu amestecul colorant şi se lasă 30 de secunde;
- ✓ se adaugă un volum egal de apă distilată neutră şi se omogenizează colorantul pe lame, cu o pipetă Pasteur. Se lasă 2 min. în repaus;
- ✓ se înlătură soluţia colorantă şi se acoperă frotiul cu apă distilată neutră, timp de 30 de secunde;
- ✓ se înlătură apa, se usucă în aer, se usucă în aer şi se examinează la microscop.

Rezultatele sunt identice cu cele obţinute prin coloraţia clasică.

C] Coloraţia frotiurilor cu albastru de metilen (metoda Manson)

Această coloraţie se poate aplica pe frotiuri realizate cu diverse produse biologice şi permite o informare rapidă asupra celulelor şi germenilor microbieni.

Colorantul Manson (cu albastru de metilen boraxat) conţine:

- borat de sodiu (borax) .....25 g
- apă distilată ..... 600 ml

Se încălzeşte şi se agită până la dizolvare.

- albastru de metilen ..... 5 g.

Se lasă să se matureze la lumină şi se filtrează.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tehnica de lucru:

✓ se fixează frotiurile la căldură, astfel: lamele cu frotiul în sus se trec rapid (5-6 secunde) printr-o flacără cu o temparatură moderată, verificându-se încălzirea cu dosul mâinii. Se poate folosi o flacără de alcool etilic, alcool metilic sau amestec etanol-eter (pentru mai multe detalii de structură);

✓ se răcește în aer frotiul fixat și se acoperă cu soluția colorantă, timp de 30-40 secunde;

✓ se spală cu apă de robinet, se usucă în aer și se examinează la microscop.

Rezultate: Se evidențiază numeroase detalii citologice și diferiți germeni microbieni.

D] Coloraţia May-Grünwald-Giemsa pentru ţesuturi

Frotiurile din sedimente celulare şi amprente de organe, precum şi secţiunile de ţesuturi, se pot colora prin metoda May-Grünwald-Giemsa, după fixare în lichide pe bază de bicromat şi sublimat.

Tehnica de lucru:

✓ mordansare în soluţie de Lugol 30 min., până la 24 de ore;

✓ decolorare cu hiposulfit 0,5%, până la decolorarea completă a preparatului;

✓ spălare cu apă distilată;

✓ colorare cu soluţie May-Grünwald diluată: 1 ml colorant + 8 ml apă distilată; colorarea se face timp de 20 min. la 37^{0}C, în etuvă (pentru animalele poikiloterme se face la temperatura camerei);

✓ colorarea cu soluţie Giemsa (0,2 ml la 15 ml apă distilată), timp de 40 min la 35^{0}C;

✓ diferenţiere rapidă în apă slab acidifiată (2-3 picături de acid acetic la 50 ml apă distilată);

✓ clătire cu apă distilată, scurgere pe o hârtie de filtru, deshidratare rapidă într-un amestec în părţi egale de alcool absolut : acetonă anhidră, apoi în xilol;

BCU "ASTRA" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

✓ montare în ulei de cedru şi examinare la microscop.

Rezultate: Nucleii se colorează în albastru, structura lor fiind bine evidenţiată. Citoplasma se colorează în diferite tonuri de roz sau albastru. Granulaţiile sunt bine evidenţiate, cu caractere specifice. Ţesutul conjunctiv se colorează în roz mai intens.

Soluţia Lugol se prepară din iod metaloid 1 g, iodură de potasiu 2 g şi apă distilată 300 ml. Se dizolvă KI în 5 ml apă distilată, se adaugă iodul (bine sfărâmat), se agită până la solvire şi se completează cu apă distilată până la 300 ml.

Frotiurile realizate din celule epiteliale descuamate sau exfoliate (din cavitatea bucală, uretră, vagin, prostată), din sedimente celulare (suc gastric, bilă, lichid cefalorahidian, lichid pleural, lichid ascitic, urină), precum şi amprentele de ţesuturi sau organe se pot colora prin metoda May-Grünwald-Giemsa ori cu hemalaun eozină (vezi tehnica descrisă).

1.3.2.8. Examinarea frotiului de sânge

După realizarea frotiului de sânge şi colorarea lui prin tehnica May-Grünwald-Giemsa, acesta se examinează la microscopul optic, pentru studierea morfologiei elementelor figurate sangvine, numărarea acestora şi calculul proporţiei dintre grupele de celule sangvine.

Examinarea frotiului se face începând cu obiectivul 10x, pentru verificarea calităţii frotiului. Apoi, frotiul se examinează fie cu obiectivul 40x, fie cu obiectivul cu imersie. Pentru obiectivul cu imersie este necesar ca pe lama cu frotiu să se pună o picătură de ulei de cedru, pentru clarificarea imaginii şi observarea unor detalii morfologice.

Se examinează: *morfologia eritrocitelor* (normală şi anomalii); *frecvenţa şi morfologia trombocitelor; frecvenţa şi morfologia leucocitelor* – în vederea

stabilirii proporţiei procentuale a diferitelor grupe de leucocite (formula leucocitară).

Pentru examinarea frotiului se aranjează condensatorul în poziţia de sus şi diafragmul deschis, reglându-se întensitatea luminii, prin modificarea fantei.

Examinarea lamei se face pe marginea frotiului, în zig-zag, începând cu extremitatea stângă şi deplasând lama într-o singură direcţie pe lungimea ei. Pentru a elimina erorile, trebuie ca lama să fie deplasată totdeauna în acelaşi sens.

A] Caracterizarea elementelor figurate sangvine

Eritrocitele alcătuiesc *seria roşie* sangvină, care este formată dintr-o singură categorie morfologică de celule, anucleate, iar leucocitele *seria albă* sangvină, care cuprinde cinci grupe de celule nucleate, diferite după mărimea lor, mărimea şi forma nucleului, prezenţa sau absenţa granulaţiilor şi culoarea acestora, precum şi culoarea citoplasmei.

Categoriile elementelor figurate sangvine şi gradul lor de maturare se evidenţiază prin gradul de bazofilie al citoplasmei elementelor tinere, acidofilia eritrocitelor mature şi afinitatea tinctorială a granulaţiilor unor grupe de leucocite.

Metoda de colorare panoptică May-Grünwald-Giemsa dă indicaţii asupra pH-ului componentelor celulare. Coloranţii acizi sunt fixaţi de componentele alcaline celulare (acidofile), iar coloranţii bazici sunt fixaţi de cele acide (bazofile). Astfel, eozina, care este un colorant acid, este fixată de granulaţiile acidofile (eozinofile) ce sunt alcaline (pH=11). Albastrul de metilen, colorant bazic, este fixat de ARN-ul din citoplasma unui eritroblast bazofil, pe care îl colorează în albastru, iar colorantul azur de metilen se fixează pe ADN-ul din nucleul acestui eritroblast bazofil. În nucleol se fixează albastrul de metilen, datorită conţinutului său în ARN de tip citoplasmic.

Gradul de maturare al celulelor poate fi urmărit prin colorarea lor: celulele tinere au citoplasma bazofilă datorită unei concentraţii mari de ARN, iar pe măsură

ce se maturează, citoplasma lor devine tot mai acidofilă, datorită scăderii concentraţiei de ARN. Astfel, se poate urmări evoluţia eritroblaştilor spre eritrocite.

La microscopul fotonic, pe un frotiu colorat după tehnica May-Grünwald-Giemsa, se pot vedea eritrocitele şi leucocitele colorate diferit, în funcţie de seria celulară (roşie sau albă), vârstă, grupa leucocitară şi sex; există însă şi variaţii în funcţie de anotimp, altitudine, activitate musculară, perioada digestiei etc (**Fig. 21**).

Pentru surprinderea detaliilor morfologice este bine ca elementele de pe frotiu să fie examinate în ordinea: eritrocite, trombocite şi apoi leucocite (care fiind mai diverse, ne pot distrage atenţia).

Aspectele caracteristice ale celulelor sangvine ce se pot vedea pe frotiu sunt următoarele:

a. Eritrocitele

Se mai numesc *globule roşii* sau *hematii* (numai la om şi celelalte mamifere, unde nu au nucleu). Se pot studia pe frotiu din sânge periferic. Apar răspândite uniform pe toată suprafaţa frotiului având o culoare roz-portocalie. Au formă de lentilă biconcavă, având aproximativ aceeaşi mărime (diametrul între 7,2 - 8,6μm, şi grosimea de 2,1μm). Prin examinarea atentă, pot fi surprinse şi unele anomalii numerice, de mărime, formă, colorabilitate, etc.

Hematiile prezintă numai citoplasmă şi membrană celulară. Mişcând şurubul micrometric al microscopului, centrul hematiilor normale apare când mai luminos, când mai întunecat faţă de margini, deoarece celulele au formă de disc biconcav. La hematiile cu anomalii, această imagine se deformează.

Citoplasma conţine proteine structurale şi protein-enzime, lipide, vitamine (în special din grupa B) şi o mare cantitate de hemoglobină, care este constituentul său principal.

Membrana plasmatică are o constituţie lipo-proteică, reprezentând un model de membrană mult studiată, deoarece hematiile se pot goli de conţinut prin hemoliză, în mediu hipotonic, plasmalema păstrându-şi forma şi cele mai multe din funcţiile sale (fantome de hematii).

Pe suprafaţa membranei se găsesc antigeni, numiţi aglutinogeni (A şi B), a căror prezenţă determină grupele sangvine (A, B, 0). Tot pe faţa externă a plasmalemei există şi factorul Rh.

Pe faţa internă a membranei există un citoschelet format din diferite tipuri de proteine, care asigură forma de discocit a eritrocitelor (spectrina, ankirina, banda3, glicoforina).

Eritrocitele iau naştere din celule de origine ce se găsesc în măduva roşie hematopoietică, din oasele late şi epifizele oaselor lungi. Din aceste celule rezultă elemente ce parcurg rapid mai multe stadii de maturare, formând seria eritrocitară: proeritroblast, macroblast, eritroblast bazofil, eritroblast policromatofil, eritroblast acidofil, reticulocit, eritrocit. Hematopoieza rezultă din diviziunea eritroblaştilor bazofili şi a celor policromatofili. Reticulocitele rezultate din diviziune părăsesc măduva osoasă şi trec în circulaţia sangvină, unde se maturează, transformându-se în eritrocite mature (hematii), în circa 48 de ore. Proeritroblastele sunt, în general, celule de rezervă, care se divid numai în urma unor stimuli hematopoietici puternici.

Aceste stadii de evoluţie a eritrocitelor se pot studia pe material obţinut prin puncţia măduvei osoase hematogene. Uneori, se pot observa celule din aceste stadii şi pe frotiul de sânge periferic (celule roşii cu nucleu).

b. **Trombocitele**

În unele lucrări sunt numite şi *globuline*, *plachete sangvine* sau *hematoblaste*.

Trombocitele se formează în măduva osoasă hematogenă, prin fragmentarea citoplasmei elementelor din seria megacariocitelor (megacarioblaste – celule cap de serie, urmate de megacariocite bazofile, promegacariocite, megacariocite granulate, metrombocitogene şi cele trombocitogene şi în final trombocite). După desprinderea din citoplasma megacariocitelor, trombocitele trec în stadiul de maturaţie.

Ele sunt implicate direct în coagularea sângelui, în procesele inflamatorii, în reacţiile imune şi în vindecarea rănilor. Au rol şi în purificarea sângelui circulant, prin endocitoza bacteriilor, a unor particule mici de cărbune etc.

Trombocitul matur este un element sangvin anucleat, având doar membrană şi citoplasmă. În fluxul circulator sangvin, trombocitul are o formă elipsoidală, de lentilă biconvexă, iar pe frotiu apare de formă poligonală, discoidală, colţuroasă, stelată, în funcţie de gradul de uscare al frotiului.

Membrana trombocitară este de natură lipo-proteică, având la suprafaţă un strat de glicoproteine care absorb unele proteine plasmatice, implicate în diferite procese ale coagulării (fibrinogenul şi factorulVIII al coagulării), ce asigură interacţiunea dintre trombocit şi peretele vascular, cu alte suprafeţe străine (adeziune) precum şi cu alte trombocite (agregare), determinând formarea coagulului sangvin. Suprafaţa externă a membranei prezintă locuri specifice, antigenice şi unii receptori pentru agenţii care stimulează sau inhibă procesul de agregare plachetară. Pe membrană există, de asemenea, şi unele ondulaţii şi prelungiri dendritiforme.

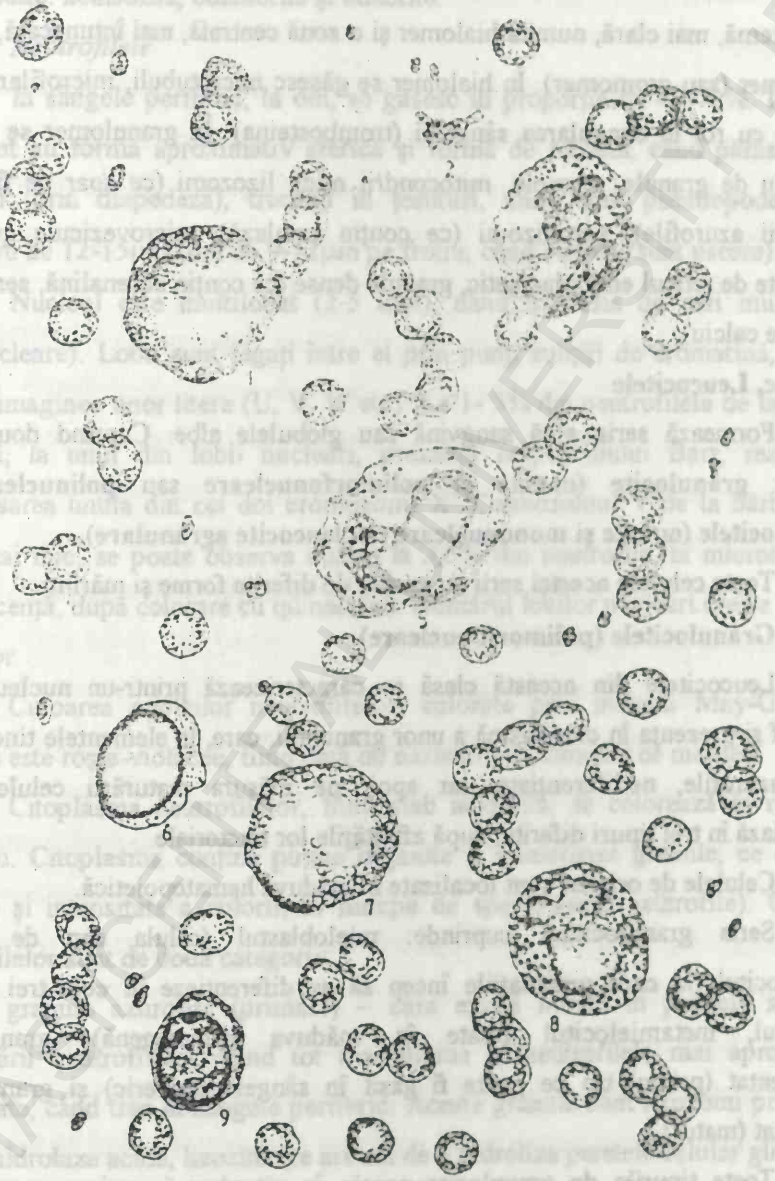


Fig. 21. Elementele figurate ale sângelui periferic uman: 1- bazofil; 2- trombocit; 3,5 – monocite; 4 – eritrocite; 6,9 – limfocite; 7 – eozinofil; 8 – neutrofil (după Cotruță și colab., 1994)

Citoplasma trombocitului, observată la microscop, prezintă două zone: o zonă externă, mai clară, numită hialomer şi o zonă centrală, mai întunecată, numită granulomer (sau cromomer). În hialomer se găsesc microtubuli, microfilamente şi proteine cu rol în coagularea sângelui (trombosteina). În granulomer se află un ansamblu de granule, vacuole, mitocondrii mici, lizozomi (ce apar pe frotiu ca granulaţii azurofile), peroxizomi (ce conţin catalază), microvezicule golgiene, fragmente de reticul endoplasmatic, granule dense (ce conţin adrenalină, serotonină şi ioni de calciu).

c. Leucocitele

Formează seria albă sangvină sau globulele albe. Cuprind două clase celulare: **granulocite** (numite şi **polimorfonucleare** sau **polinucleare**) şi **agranulocitele** (numite şi **mononucleare** sau **leucocite agranulare**).

Toate celulele acestei serii au nucleu de diferite forme şi mărimi.

- **Granulocitele (polimorfonucleare)**

Leucocitele din această clasă se caracterizează printr-un nucleu lobat, polimorf şi prezenţa în citoplasmă a unor granulaţii, care, la elementele tinere sunt iniţial azurofile, nediferenţiate, iar apoi, pe măsura maturării celulelor, se diferenţiază în trei tipuri diferite, după afinităţile lor tinctoriale.

Celulele de origine sunt localizate în măduva hematopoietică.

Seria granulocitară cuprinde: mieloblastul (celula cap de serie), promielocitul (la care granulaţiile încep să se diferenţieze în cele trei tipuri), mielocitul, metamielocitul (toate în măduva hematogenă), granulocitul nesegmentat (primul tip ce poate fi găsit în sângele periferic) şi granulocitul segmentat (matur).

Toate tipurile de granulocite conţin în citoplasmă enzime specifice – oxidaze şi peroxidaze – încă din stadiul de promielocit, spre deosebire de celulele tinere ale seriei limfocitare.

După afinitatea tinctorială a granulelor din citoplasmă, există trei clase de granulocite: neutrofile, eozinofile şi bazofile.

Neutrofilele

În sângele periferic, la om, se găsesc în proporţie de 40-70%. În sângele circulant au formă aproximativ sferică şi formă de rachetă, când părăsesc vasul sangvin (prin diapedeză), trecând în ţesuturi, unde emit pseudopode. Au un diametru de 12-15µm (sau de 9-12µm pe frotiu, când celulele sunt uscate).

Nucleul este multilobat (2-5 lobi), dând impresia de mai mulţi nuclei (polinucleare). Lobii sunt legaţi între ei prin punţi subţiri de cromatină, formând uneori imaginea unor litere (U, V, W etc). La 1- 5% din neutrofilele de la femei se observă, la unul din lobii nucleari, prezenţa corpusculului Barr, rezultat din condensarea unuia din cei doi cromozomi X. Cromozomul Y de la bărbaţi, fiind mult mai mic, se poate observa numai la 3,5% din neutrofile, la microscopul cu fluorescenţă, după colorare cu quinacrină. Numărul lobilor nucleari creşte cu vârsta celulelor.

Culoarea nucleilor neutrofilelor, colorate prin metoda May-Grünwald-Giemsa este roşie-violacee, fiind dată de eozinatul de albastru de metilen.

Citoplasma neutrofilelor, fiind slab acidofilă, se colorează în roz pal – violaceu. Citoplasma conţine puţine organite şi numeroase granule, ce diferă ca mărime şi intensitate a culorii, în funcţie de specie (sunt heterofile). Granulele neutrofilelor sunt de două categorii:

✓ granule azurofile (primare) – care există numai în primele stadii ale dezvoltării neutrofilelor, fiind tot mai puţine la neutrofilele mai apropiate de maturitate, când trec în sângele periferic. Aceste granule sunt lizozomi primari, ce conţin hidrolaze acide, lizozim (ce are rol de a hidroliza peretele celular glicozidic

al bacteriilor) şi mieloperoxidază (cu rol bactericid, prin eliberarea şi activarea O_2 din H_2O_2).

✓ granule specifice (secundare) – care conţin substanţe ce inhibă dezvoltarea microorganismelor: lizozim, lactoferină (ce leagă fierul circulant, făcând ca acesta să nu mai fie disponibil pentru bacterii), fagocitine (cu rol bacteriostatic), fosfataza alcalină, acid lactic, acizi graşi şi lectine. Aceste granule apar colorate pe frotiu în nuanţe de brun.

Membrana neutrofilelor este de natură lipo-proteică, având şi un strat glucidic (glicocalix). Celulele emit, prin deformarea plasmalemei, numeroase pseudopode, ce conţin microtubuli şi filamente de actină, cu ajutorul cărora celula trece prin peretele vaselor sangvine (diapedează) şi se deplasează în ţesuturi, asigurând rolul imunitar al acestor celule.

Funcţia esenţială a neutrofilelor este aceea de celule microfage, fagocitând particule de talie mică.

Eozinofile

Se mai numesc *acidofile* şi reprezintă 1-5% din totalitatea leucocitelor. Sunt de talie mai mare decât neutrofilele (12-15μm).

Nucleul apare bilobat (ca o desagă), cei doi lobi fiind uniţi printr-o punte de cromatină. Lobii conţin eucromatină în zona centrală şi heterocromatină în zona periferică. Pe frotiu, nucleul apare colorat în roşu-violaceu (coloraţie May-Grünwald-Giemsa).

Citoplasma apare colorată în roz, fiind intens acidofilă. Conţine mai multe organite decât în cazul neutrofilelor. Pe frotiu se observă numeroase granule, mai mari (1μm), colorate în portocaliu strălucitor cu nuanţe roşietice, cu aspect de "icre de Manciuria". Granulele conţin hidrolaze acide de tip lizozomal şi histone (proteine bazice), precum şi histamină sau acetilcolină.

Membrana are structură lipo-proteică şi formează pseudopode rare şi mici, care asigură mişcarea ameboidală a acestor celule.

Funcţiile eozinofilelor sunt mai diverse. Ele au rol de celule microfage, cu putere fagocitară slabă şi selectivă pentru factorii bacterieni solubili. De asemenea, eozinofilele intervin în bolile alergice şi parazitare, care determină eozinofilie (creşterea numărului de eozinofile), având rol antihistaminic şi acumulându-se în zonele cu concentraţie crescută de histamină. In unele tumori (boala Hodgkin), ele dau reacţii de tip imun. De asemenea, intervin în coagularea sângelui, conţinând profibrinolizină.

Bazofilele

Au talie mai mică decât celelalte granulocite (9-11μm), formă uşor rotunjită şi sunt cele mai mai puţine din totalul leucocitelor (la om 0,5%).

Nucleul apare cu lobi puţini, de obicei trilobat, ca o frunză de trifoi sau ca litera S, fiind de culoare mai închisă.

Citoplasma este bazofilă, conţinând puţine organite celulare şi granulaţii relativ numeroase, de dimensiuni inegale şi răspândite neregulat, perinuclear sau la periferia celulei; în unele celule, apar în toată citoplasma, acoperind şi nucleul.

Granulaţiile apar colorate metacromatic în albastru-violet închis, cu nuanţe negricioase. Sunt foarte sensibile, dispărând uşor în apă, din cauza componenţilor solubili (glicozaminoglicani). Cele mai multe granule sunt specifice, conţinând histamină, serotonină, heparină şi o substanţă lipidică, slab reactivă, probabil din grupa prostaglandinelor. Unele granule sunt lizozomi primari.

Membrana este de natură lipo-proteică, având pe suprafaţa externă glicocalix şi receptori pentru imunoglubuline (IgE).

Funcţiile bazofilelor sunt specifice, ele intervenind în stările inflamatorii, de şoc şi de stres, prin substanţele din granulele lor specifice, pe care le eliberează

BCU IASI - TRANSILVANIA UNIVERSITY LIBRARY

la contactul cu substanţele străine, antigenice. Bazofilele sunt capabile de deplasare în ţesuturi, prin mişcări ameboidale.

- **Leucocitele agranulare (mononucleare)**

Sunt leucocite cu nucleul nelobat, rotund, reniform, sau uşor polimorf. Au dimensiuni diverse, cuprinse între 7-25μm. Citoplasma este bazofilă, fără granulaţii sau cu granulaţii foarte fine, colorate în roşu-azuriu.

După dimensiune şi aspectul nucleului şi al citoplasmei, leucocitele agranulare se împart în două clase: *limfocite* şi *monocite*.

Limfocitele

Fac parte din seria limfocitară care cuprinde: limfoblastul, prolimfocitul, limfocitul. Morfologia şi dimensiunile celulelor din serie diferă în funcţie de gradul de maturare. Limfoblastul şi prolimfocitul nu trec în sângele periferic, în mod normal. Celulele de origine ale seriei limfocitare se găsesc în ganglionii limfatici şi în alţi foliculi limfatici răspândiţi în organism (splină, timus, plăcile Peyer din intestinul subţire).

Limfocitele se găsesc în sângele periferic, în proporţie de 25-45% din leucocitele totale. Au formă rotundă sau uşor ovală şi dimensiuni de 7-15μm. Există şi limfocite mici (5-8μm), sau mai mari (12-20μm).

Nucleul este rotund, ovalar, sau uneori ştirbit într-o parte şi adesea aşezat excentric. Are dimensiuni mari, lăsând doar o porţiune îngustă de citoplasmă în jurul lui. Este intens colorat (tahicromatic), ca o pată de cerneală, deoarece conţine o mare cantitate de heterocromatină, intens bazofilă.

Citoplasma este redusă, sub forma unui inel perinuclear, bazofilă, de culoarea cerului senin. Conţine puţine organite celulare, vizibile sub forma unor granulaţii azurofile.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Membrana are structură lipoproteică şi prezintă la suprafaţă un înveliş glicoproteic, de grosime redusă.

Limfocitele au mişcări de deplasare foarte active, luând în mişcare uneori forma unei oglinzi cu mâner. Mişcările de locomoţie sunt asemănătoare cu cele ale granulocitelor, dar limfocitele nu prezintă fagocitoză, ele fiind implicate în sinteza de anticorpi. De asemenea, limfocitele se pot transforma în fibrocite (celule conjunctive) participând la refacerea ţesuturilor lezate şi cicatrizarea rănilor.

Citoplasma limfocitelor prezintă, de asemenea, mişcări intense, ceea ce determină deplasarea intracelulară a organitelor.

Monocitele

Monocitele se formează în ţesutul reticuloendoteliar din diferite organe şi ţesuturi, ca: măduva osoasă, splina sau plămâni, ficat, ţesut subcutanat etc. Aici se găsesc celule reticulare care dau naştere monoblastelor, din care se dezvoltă seria monocitară.

Seria monocitară cuprinde: monoblastul (care poate sau nu să evolueze spre monocit), promonocitul (care rămâne în ţesuturi, unde evoluează, încărcându-se cu granulaţii azurofile) şi monocitul (formă matură), care trece în sângele periferic.

Monocitele reprezintă formele circulante ale celulelor macrofage. În sângele periferic, monocitele se găsesc în proporţie de 5-8 % din leucocitele totale. Au formă rotunjită şi sunt cele mai mari celule din sângele periferic, având dimensiuni de 15- 25µm.

Nucleul este nesegmentat, de talie mare, cu formă ovalară, fiind adesea şi reniform sau polimorf (decupat, în potcoavă, dedublat etc.) Cromatina apare aranjată sub forma unei table de şah, în care heterocromatina reprezintă zonele întunecate, iar cromatina pe cele clare. Astfel, nucleul apare amblicromatic.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Citoplasma este destul de abundentă, slab bazofilă, de culoare spălăcită, albastră-cenuşie, ca cerul, înainte de furtună. În citoplasmă există organite destul de numeroase, reprezentate de granule azurofile (lizozomi), vizibile mai ales în scobitura nucleului. Uneori se observă resturi celulare pe cale de dezintegrare, rezultate din fagocitoză (monocitele fiind macrofage).

Membrana este de natură lipoproteică şi prezintă numeroase microvilozităţi şi vezicule de pinocitoză şi micropinocitoză. De asemenea, membrana formează pseudopode, cu ajutorul cărora monocitele se deplasează în afara vaselor sangvine. Pe suprafaţa membranei monocitelor active (şi a macrofagelor) există receptori pentru imunoglobuline - IgG (subclasele IgG_1 şi IgG_3) şi pentru fracţiunea C_3 a complementului.

Funcţia principală a monocitelor este cea de celule macrofage, ele fagocitând particule de talie mare (bacterii, celule întregi sau resturi celulare, virusuri, complexe antigen-anticorp, corpuri străine anorganice). Au şi rol în producerea de anticorpi.

B] Formula leucocitară

Raportul procentual al tipurilor de leucocite, calculat la 100 de celule leucocitare de pe frotiul de sânge examinat la microscop, reprezintă **formula leucocitară**. Plecând de la proporţia procentuală a tipurilor de leucocite găsite pe frotiu, prin raportare la numărul total de leucocite (pe mm^3 de sânge), găsit cu ajutorul hemocitometrului, se poate calcula **numărul absolut al fiecărui tip de leucocite pe mm^3**.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

a. Formula leucocitară

Se stabileşte prin examinarea microscopică a frotiului, colorat prin tehnica May-Grünwald-Giemsa.

Tehnica de lucru:

✓ se aşează lama cu frotiu la microscop şi se examinează, cu obiectivul mic, repartiţia leucocitelor pe frotiu. Numărarea acestora se realizează optim cu obiectivul cu imersie. Pentru imersie, se aplică o picătură de ulei de cedru pe marginea lamei cu frotiu, se coboară obiectivul de imersie (90x) până atinge picătura şi se clarifică imaginea, cu diafragmul deschis şi condensatorul sus;

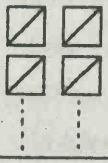
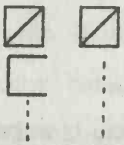
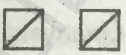
✓ se începe numărarea categoriilor de leucocite, observând cu atenţie caracteristicile specifice ale fiecărui tip de leucocite. Se urmăresc leucocitele de pe o margine a lamei, înaintându-se în zig-zag şi deplasând totodată frotiul în câmpul microscopului, totdeauna în acelaşi sens (de ex. de la stânga la dreapta), pentru a nu număra de două ori aceleaşi celule;

✓ pe măsură ce se întâlnesc leucocite dintr-o anumită categorie, acestea se notăm cu o linie, într-un tabel, în dreptul simbolului tipului leucocitar (N, E, B, L, M), în grupe de 5 sau 10 celule, ţinându-se astfel "scorul" lor (**TABEL V**). Se numără în total 200 sau 400 de celule de toate tipurile şi se calculează apoi procentajul acestora (n_N %; n_E%; n_B% etc), după formula:

$$n\,\% = \frac{\text{numărul de leucocite de un tip x 100}}{\text{totalul tuturor leucocitelor numărate}}$$

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

TABEL V Realizarea numărării leucocitelor în vederea stabilirii formulei leucocitare

N	E	B	L	M	
					
130	2	2	56	10	Total = 200
65%	1%	1%	28%	5%	100%

Exemplu: S-au numărat în total 200 leucocite de toate tipurile, din care 130 neutrofile (N), 2 eozinofile (E) etc. Aplicând regula de trei simplă, procentul fiecărui tip de leucocite se calculează după formulele:

$$n_N\,\% = \frac{130 \times 100}{200} = 65\,\%\ \text{neutrofile;}$$

$$n_E\,\% = \frac{2 \times 100}{200} = 1\%\ \textit{eozinofile.}$$

Se procedează identic şi cu B, L şi M.

b. Numărul absolut de leucocite pe mm^3

Cunoscând numărul total de leucocite numărate la hemocitometru (de ex. 6.200/mm^3) şi valoarea procentuală a fiecărei clase leucocitare, calculată de pe frotiu, se poate calcula numărul absolut al fiecărui tip de leucocite pe mm^3 de sânge (n/mm^3), după formula:

$$\text{n/mm}^3 = \frac{\text{leucocite tot./mm}^3 \times \text{nr.\% dintr-o clasă}}{100}$$

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Exemplu: Conform regulii de trei simplă, dacă:

100 % ....6.200/mm^3 leucocite totale

65 % .....n/mm^3 neutrofile

$$n/mm^3 = \frac{65 \times 6.200}{100} = 4.030 / mm^3 \text{ neutrofile.}$$

Valorile normale ale hemoleucogramei (la om) depind de: vârsta şi sexul indivizilor, la nou-născuţi fiind valori mai mari pentru neutrofile, bazofile şi monocite (şi mielocite) şi mai mici pentru eozinofile şi limfocite. De asemenea, valorile variază în funcţie de anotimp, altitudine (poliglobulie), activitatea musculară intensă (leucocitoză), activitatea digestivă (proteinele produc leucocitoză, iar alte alimente, leucopenie). Variaţii semnificative apar în stările patologice.

Formula leucocitară normală (la omul adult)

Granulocite neutrofile nesegmentate (NN)	1 - 4 %
Granulocite neutrofile segmentate (NS)	60 - 70 %
Granulocite eozinofile (E)	1 - 4 %
Granulocite bazofile (B)	0,5 - 1 %
Limfocite (L)	25 - 35 %
Monocite (M)	4 - 8 %

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Valorile absolute pe mm³ (la omul adult)

Granulocite neutrofile nesegmentate	50 - 320/ mm³
Granulocite neutrofile segmentate	2.500 - 4.800/mm³
Eozinofile	100 - 200/mm³
Bazofile	25 - 80/mm³
Limfocite	1.250 - 2.400/mm³
Monocite	300 - 640/mm³

La alte animale, valorile formulei leucocitare depind de specie:

Elementele figurate din sângele de iepure

Eritrocite: 4 - 6,4 milioane/mm³

Leucocite totale: 8.000/mm³

Neutrofile: 8 - 50%, 640-4.000/mm³

Eozinofile: 1-3 %, 80 - 240/mm³

Bazofile: 0,5 - 30 %, 40 - 2.400/mm³

Limfocite: 20 - 90 %, 1.600 - 7.200/mm³

Monocite: 1 - 4 %, 80 - 320/mm³

Elementele figurate din sângele de şobolan

Eritrocite: 8 milioane/mm³

Leucocite totale: 12.000/mm³

Neutrofile: 18 - 36%, 2.160 - 4.320/mm³

Eozinofile: 1-4%, 120 - 480/mm³

Bazofile: 0 - 1 %, 0 - 120/mm³

Limfocite: 62 - 75 %, 7.440 - 9.000/mm³

Monocite: 1 - 6 %, 120 - 720/mm³

Notă: La şoarece şi la cobai, valorile formulei leucocitare sunt asemănătoare cu cele de la şobolanul alb (Wistar).

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

1.3.2.9. Măsurarea dimensiunilor celulare

Diametrul celulelor sangvine (ca şi al altor celule), se poate determina la microscopul fotonic pe frotiuri de sânge colorate după metoda May-Grünwald-Giemsa sau pe alte preparate microscopice (secţiuni de ţesuturi, culturi celulare etc.). Pentru aceasta se utilizează un micrometru ocular etalonat cu ajutorul unui micrometru obiectiv sau a reţelei caroiate de pe lama unei camere de numărare a eritrocitelor. Rezultatele se înscriu şi pe grafice.

A] Tehnica determinării diametrului celular

Necesar: microscop, micrometru ocular, micrometru obiectiv sau hemocitometru, frotiu de sânge colorat cu May-Grünwald-Giemsa (vezi tehnica de colorare).

Tehnică de lucru:

✓ se aşează lama cu frotiul de sânge colorat, la un microscop având micrometrul ocular aranjat în ocular, cu scara gradată aşezată orizontal de la stânga la dreapta şi se clarifică imaginea utilizând obiectivul cu imersie;

✓ se mişcă frotiul în sens vertical şi se măsoară 100-500 de eritrocite, la întâmplare, suprapunându-le exact pe scara gradată a micrometrului. Se notează într-un tabel diviziunile oculare care se transformă apoi în micrometri, conform etalonării micrometrului ocular. Nu se măsoară celulele distruse sau hemolizate. Valorile calculate se înscriu pe o curbă.

Calcularea diametrului mediu celular

Se adună diametrele a 100 de celule măsurate şi valoarea se împarte la 100.

Exemplu: dacă suma diametrelor a 100 de eritrocite este de 720 μm, diametrul mediu celular este de 7,2 μm.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Construirea curbei Price-Jones

Pe un sistem de coordonate se înscriu, pe abscisă, diviziunile în μm, din 0,5 în 0,5, iar pe ordonată numărul procentual de eritrocite care corespunde fiecărui diametru, între limite de 0,5 μm (Fig.22.).

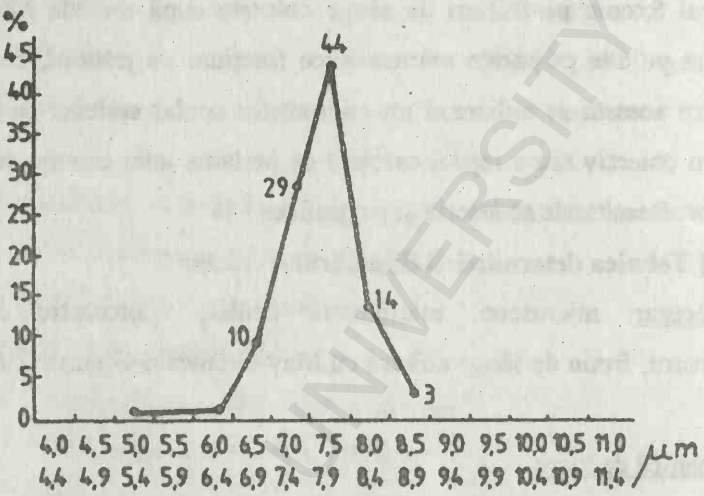


Fig. 22. Curba Prince-Jones (după V. Kondi)

Se construieşte o curbă, care în mod normal se întinde între 5-9 μm, cu o valoare medie de 7,2 μm, diametrele având următoarea repartiţie aproximativă (TABEL VI):

TABEL VI Diametrul eritrocitelor şi proporţia procentuală

Diametrul (μm)	Eritrocite (%)
5,5-6	2
6,0-6,9	10
7,0-7,4	27
7,5-7,9	44
8,0-8,4	14
8,5-8,9	3

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Se admit ca limite normale ale diametrului mediu eritrocitar, pentru om, valorile de 6,68-7,72 μm.

Există însă variaţii fiziologice şi patologice.

Variaţii în funcţie de vârstă: la nou-născut (primele două săptămâni), variaţii între 8-8,82 μm, cu anizocitoză (valori diverse). După două săptămâni valorile scad la 7 μm (12 luni), apoi cresc până la 9 ani, când se ajunge la valorile adultului (7,2-7,4 μm).

Variaţii patologice: variaţiile diametrului celular determină variaţii ale curbei Prince-Jones:

✓ deviere spre stânga, cu vârful curbei la valoarea de 6 μm – în microsferocitoză (în caz de icter hemolitic congenital) sau microcitoză (anemii hipocrome);

✓ deviere spre dreapta, cu vârful la valoarea de 9 μm – în macrocitoză, megalocitoză;

✓ curbă cu două vârfuri (unul normal, altul deviat spre stânga) ce indică două populaţii diferite de celule sangvine – în cazul unor transfuzii (microcite ale bolnavului şi normocite transfuzate);

✓ curbă mult lărgită, cu vârful deviat – în anizocitoză, cu predominanţă microcitară (vârf spre stânga) sau macrocitară (vârful spre dreapta). Baza normală a curbei: 5-9 μm, frecvent între 5,5-8,5 μm.

B] Determinarea grosimii eritrocitelor

Necesar: lame, lamele, micrometru ocular etalonat (pentru obiectiv imersie 1/12, ocular 4), vaselină.

Tehnica de lucru:

✓ se recoltează sânge pe anticoagulant, din care o parte se centrifughează. Se separă plasma de elementele figurate, păstrându-se ambele componente;

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

✓ din sângele sterilizat, necentrifugat, se ia o picătură care se diluează pe o sticlă de ceas în 7 picături de plasmă separată prin centrifugare;

✓ pe o lamă degresată se pune puţină vaselină (cât o gămălie de ac) şi se delimitează un contur pătrat, de dimensiunea lamelei. În centru se pune o picătură din sângele pregătit, peste care se pune lamela, apăsând-o uşor, până când se realizează o cameră umedă închisă ermetic. La microscop se observă că hematiile se dispun în fişicuri;

✓ utilizând micrometrul ocular etalonat pentru sistemul optic respectiv, se măsoară lungimea a circa 10 fişicuri, alegând pe cele compuse din cel puţin 6 hematii aranjate cât mai rectiliniu posibil. Pentru fiecare fişic se notează lungimea lui şi numărul de hematii ce-l compun. Pentru aflarea grosimii medii a hematiilor se împarte lungimea fişicului la numărul de hematii ce-l compun. Se poate face o medie a mediilor mai multor fişicuri sau se calculează suma lungimii tuturor fişicurilor măsurate şi se împarte la numărul total de hematii.

Grosimea (G) se poate calcula şi printr-o formulă generală, cunoscând diametrul mediu eritrocitar (D) şi volumul mediu eritrocitar (V).

$$G = \frac{4 \cdot V}{\pi \cdot D^2} \quad \text{sau} \quad G = \frac{14 \cdot V}{11 \cdot D^2}$$

Grosimea normală (la om): 1,7-2,5 μm, cu o valoare medie de 2,1 μm. Valori peste 2,5 μm – în sferocitoză (ca în icter hemolitic); valori sub 1,7 μm – plasticite (leptocite).

C] Determinarea unor constante eritrocitare derivate şi a unor indici globulari

Cunoscând unele valori eritrocitare, ca numărul total de eritrocite pe 1 mm^3, hematocritul, diametrul eritrocitar mediu, concentraţia procentuală de

hemoglobină, se pot calcula o serie de constante eritrocitare. **(Kondi, 1981; Tudoranu şi colab., 1959)**

a. Volumul eritrocitar mediu (VEM) sau volumul globular mediu (VGM)

Se calculează după formula:

$$VEM = \frac{Ht \times 10}{N} \quad (\mu m^3) \text{ în care:}$$

- Ht = cifra hematocritului (%);
- N = număr de eritrocite pe 1 mm^3 (numai cifrele care exprimă numărul de milioane, fără zerouri – de exemplu: 5; 5,7; 6,1).

Valòri normale (la om): 82 - 92 μm^3 (normocite); VEM crescut (macrocite şi megalocite): 110-140 μm^3; VEM scăzut (microcite): 50-70 μm^3.

Determinarea VEM dă indicaţii asupra anemiilor macrocitare, microcitare sau normocitare şi asupra modificărilor de permeabilitate celulară.

Exemplu: la un hematocrit de 45% şi N=5.000.000 pe mm^3

$$VEM = \frac{45 \times 10}{5} = 90\ \mu m^3$$

b. Indicele de sfericitate (IS sau I.Sf.)

Reprezintă raportul dintre diametrul mediu (D) şi grosimea medie (G):

$$I.Sf. = \frac{D}{G}$$

Valorile normale (la om): între 2,4-4,2 (frecvent între 3,1-3,7), cu o medie de 3,4. Valorile mai mari de 4,2 arată o turtire a eritrocitului (plasticitoză), iar valorile mai mici de 2,4, indică o sferocitoză.

BCU "VASILE GOLDIŞ" ARAD UNIVERSITY LIBRARY

c. Suprafaţa eritrocitară medie (S)

Se calculează după formula:

$$S = \frac{\pi D^2}{2} + \frac{4V}{D} \ (\mu m^2), \text{ unde:}$$

- D = diametrul eritrocitar mediu;
- V = volumul eritrocitar mediu (VEM).

Valorile normale (la om): 130 μm^2, cu limite între 120-135 μm^2. Valoarea lui S dă indicaţii asupra unei macrocitoze sau microcitoze.

d. Valoarea globulară (VGl)

Reprezintă raportul dintre hemoglobina procentuală (Hb%) şi numărul de hematii (N) pe mm^3 de sânge. Arată cantitatea de Hb dintr-o hematie, raportată la normal. Se calculează după formula:

$$VGl = \frac{HB\%}{N \times 2}, \text{ unde:}$$

- N = primele două cifre ale numărului de eritrocite pe mm^3 de sânge.

VGl *normală* (la om): 1.

Exemplu: dacă Hb%=40% şi N=2.500.000/mm^3:

$$VGl = \frac{40}{25 \times 2} = \frac{40}{50} = 0,8$$

e. Indicele de culoare (IC) sau indicele de saturaţie (I.St.)

Reprezintă raportul dintre valorile determinate şi cele normale ale **Hb%** şi **N.**

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

$$I\,C = \frac{\dfrac{Hb\%\ gasita}{Hb\%\ normala}}{\dfrac{N\ gasit}{N\ normal}}$$

Valorile normale (la om): 1 (cu limitele 0,85 - 1,15). Valori sub 0,85: hipocromie. Valori peste 1,15: hipercromie.

f. Conţinutul eritrocitar mediu de hemoglobină (CEMH)

Reprezintă cantitatea de hemoglobină conţinută într-un eritrocit. Se exprimă în nanograme (ng) sau microgamma (γ-γ). Se calculează după formula:

$$\mathbf{CEMH} = \frac{Hb(g\,/\,1000\ ml\ sange)}{N}, \text{ unde}$$

- **Hb** = grame la 1.000 ml sânge;
- N = număr eritrocite pe mm^3 sânge (în milioane).

CEMH se poate calcula şi plecând de la Hb, exprimată în g / 100ml sânge şi N/mm^3 sânge, astfel:

$$\mathbf{CEMH} = \frac{Hb\% \times 10}{N}$$

Exemplu: dacă Hb = 150g la 1.000 ml sânge şi N = 5.000.000 pe mm^3,

$$CEMH = \frac{150}{5} = 30\ ng \text{ sau } \gamma\,\gamma.$$

Valori normale (la om): 26 - 31 ng. Valori mai mari se întâlnesc la macrocite şi megalocite; iar valori subnormale, la microcite.

BCU IAŞI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

g. Concentraţia hemoglobinică eritrocitară medie (CHEM)

Reprezintă concentraţia în hemoglobină a unui eritrocit, exprimată în procente, sau procentul din volumul eritrocitelor ocupat de hemoglobină:

$$\textbf{CHEM} = \frac{\text{Hb(g / 100ml sange)} \times 100}{\text{hematocrit}} = \frac{\text{Hb\%} \times 100}{\text{Ht\%}} \ (\%), \text{ unde:}$$

Hb % = hemoglobina, în grame la 100 ml sânge;
Ht % = hematocritul (sau volumul eritrocitelor – în % din volumul sangvin).

Valorile normale (la om): 32-34 %. Concentraţia de hemoglobină nu depăşeşte 34%, de aceea nu există hipercromie. În microcitoză şi hipocromie concentraţia Hb scade la 28 - 25%.

Exemplu: pentru sânge cu 15 g hemoglobină la 100 ml şi hematocrit 45 %:

$$\textbf{CHEM} = \frac{1{,}5 \times 100}{45} = 33\%$$

1.3.2.10. Anomalii eritrocitare

Pe frotiu se pot surprinde, în anumite cazuri, anomalii ale eritrocitelor, care pot fi anomalii numerice, de talie, formă sau colorabilitate, granulaţii, eritrocite nucleate, resturi nucleare, distrofii eritrocitare etc.

Forma normală a eritrocitelor este cea de disc biconcav (discocit), diametrul mediu al eritrocitelor la om fiind de 7,2-8,6 μm şi grosimea medie de 2,1μm.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Pe lame necolorate, eritrocitele apar foarte slab colorate în galben-verzui. Pe lame colorate după tehnica May-Grünwald-Giemsa, eritrocitele apar colorate în roz-roşietic - portocaliu, uniforme ca mărime (izocitoză) şi culoare (izocromie).

Leucocitele apar cu nuleul colorat în nuanţe de violet şi citoplasma roz-albăstruie, cu sau fără granulaţii fine, în funcţie de tipul leucocitelor (vezi formula leucocitară). Pot apare şi celule imature trecute în sânge (reticulocite, eritroblaste).

A] Anomaliile numerice eritrocitare

Se pot manifesta atât prin scăderea numărului de celule pe mm^3 (sindromul anemic), când scade hematocritul, iar sângele apare mai diluat, mai fluid şi mai sărac în hemoglobină, cât şi prin creşterea numărului de eritrocite (poliglobulie), când creşte hematocritul, iar sângele este mai concentrat, mai vâscos, mai bogat în hemoglobină.

B] Anomalii de talie ale eritrocitelor

Se manifestă prin apariţia următoarelor tipuri de eritrocite:

a. Microcitele – au diametrul mic, de 5-6μm, grosimea de 1,6-1,9μm, VEM de 50-70μm^3, suprafaţa de 100-120μm^2. Sunt celule sărace în hemoglobină şi pe frotiu prezintă o zonă mai clară, în centru. Caracterizează anemiile hipocrome feriprive (după hemoragii). Apar ca normale la indivizii care trăiesc la altitudini mari.

b. Macrocitele – sunt eritrocite mature mari, cu diametrul de 8-10μm, cu formă normală şi raportul diametru/grosime normal, egal cu 3,4. Au depresiunea centrală normală, (spre deosebire de megalocite, la care lipseşte). Se întâlnesc în insuficienţă hepatică.

c. Megalocitele – sunt eritrocite mature voluminoase, mai mari decât macrocitele, adesea de formă eliptică, având diametrul mare de 10-15μm şi cel mic de 7-8μm. Depresiunea centrală lipseşte, sau este slabă. VEM este crescut, între

110-140μm^3, iar grosimea de asemenea, crescută, de 2,2 μm. Pe frotiu apar bine colorate în roz, cu hemoglobină normală. Provin dintr-o inhibare a maturației megaloblaștilor bazofili (proliferare homoplastică).

Odată cu creșterea volumului eritrocitar poate crește și cantitatea de hemoglobină, dar concentrația Hb/eritrocit nu depășește niciodată 34 %.

d. Schizocitele – sunt eritrocite mici, cu diametrul de 2-4μm, rotunde sau deformate, de obicei hipocrome. Cele rotunde, mici, se mai numesc microciclocite, iar cele deformate, neregulate sunt numite schizocite. Provin din fragmentarea patologică a eritrocitelor. Se întâlnesc în anemii hipocrome grave și în "*anemia mediteraneană*".

Anizocitoza reprezintă o variație importantă de talie a eritrocitelor de pe frotiu. Pe curba Price-Jones, anizocitoza determină o lărgire a bazei curbei și un vârf turtit, deviat spre stânga sau spre dreapta, după cum predomină microcitele sau macrocitele. Pot fi evidențiate și eritrocite tinere (bazofile) sau reticulocite, de dimensiuni mai mari. Aceste elemente tinere determină diferențe tinctoriale (policromatofilie), se întâlnesc în anemii și reflectă existența unei hematopoieze accelerate.

C] Anomalii de formă

Conduc la apariția următoarelor eritrocite anormale:

a. Sferocitele – sunt eritrocite cu un diametru maxim de 6μm, cu formă aproape sferică, fără concavitate centrală. Raportul diametru/grosime (indice de sfericitate) are o valoare medie mai mică de 2,4 indicând o sferocitoză (valoarea normală a acestui raport este de 2,4 - 4,2, în medie 3,4).

Apar în anemiile hemolitice dobândite și, posibil, prin acțiunea anticorpilor. Apar, de asemenea, în icterul hemolitic congenital, numit și

BCU IAȘI UNIVERSITY LIBRARY

sferocitoză ereditară. Pot apare şi la modificarea permeabilităţii membranare şi a structurii citoscheletului.

Sferocitele nu trebuie confundate cu microcitele, deşi au diametrul scăzut faţă de cel normal. Diferenţa între ele constă în faptul că sferocitele au un volum normal şi încărcarea în hemoglobină normală, fiind bine colorate pe frotiu, în timp ce microcitele au un volum mult scăzut şi sunt hipocrome.

b. Platicitele (sau **leptocitele**) – sunt eritrocite cu grosime redusă, diametru crescut şi indice de sfericitate mai mare de 4,2. Forma discoidală şi VEM se păstrează în limite normale.

c. Ovalocitele (sau **eliptocitele**) – reprezintă eritrocite de formă ovală, întâlnite în ovalocitoza constituţională. Se pot găsi şi în mod normal în sânge în proporţie de 10-15 % din eritrocite.

d. Drepanocitele (eritrocite falciforme) – au formă de seceră, virgulă sau bastonaş îndoit. Apar în cazul afecţiunii genetice drepanocitoza (hemoglobinoza S), caracterizată prin prezenţa hemoglobinei S, corelată cu aspectul falciform, în talasemie sau ca urmare a deficitului de fier în organism. Sunt forme ireversibile.

e. Poikilocitele – sunt eritrocite cu formă de rachetă de tenis, de pară sau cu contur oval dantelat şi foarte diverse ca talie. Apar în anemii grave, fiind rezultatul unei fragilităţi celulare crescute, ce se manifestă la întinderea frotiului.

f. Celulele în ţintă – au un aspect de "*semn de tras la ţintă*", prezentând marginea şi centrul bine colorate în roz, între care există un inel clar. Se întâlnesc în anemii hipocrome, anemia Cooley şi la indivizii normali splenectomizaţi.

g. Corpii în semilună – sunt artefacte apărute la întinderea frotiului, în cazul eritrocitelor foarte labile. Sunt slab colorate şi mai lungi decât celulele normale, datorită întinderii. Apar în anemii hemolitice determinate de intoxicaţii, în anemia Biermer şi în paludism.

BCU "CAROL I" UNIVERSITY LIBRARY

D] Modificări ale formei eritrocitelor în funcţie de pH, starea plasmei şi a citoscheletului

Forma normală a eritrocitelor este cea de disc biconcav (discocite).

În funcţie de valoarea pH-ului extracelular şi concentraţia celulară de ATP, apar unele modificări ale formei eritrocitelor, care implică şi unele modificări ale membranei celulare.

a. Sferocitele – sunt eritrocite de formă sferică având diametrul mai mic decât cel normal. Sunt bine colorate pe frotiul prelucrat prin metoda May-Grünwald-Giemsa. Membrana celulară este bine întinsă. Apar în stări patologice sau ca urmare a modificarii permeabilităţii membranare.

b. Stomatocitele – sunt eritrocite de formă rotundă, prezentând pe o faţă o adâncitură sub forma de gură (*"stoma"*). Ele pot fi reversibile, când apar la pH uşor acid (sub 7) şi revin la forma normală, de discocit, la revenirea pH-ului la valoarea normală. În cazul hemoglobinopatiilor, apar stomatocite ireversibile (Fig. 23).

c. Echinocitele – sunt eritrocite sferice, care au pe suprafaţa lor 20-30 prelungiri egale, sub forma de ţepi de arici (*"echinos"*), aşezaţi la distanţe egale. Pot fi reversibile, când apar la scăderea concentraţiei intracelulare de ATP şi în mediul extracelular. Refacerea concentraţiei normale de ATP determină transformarea echinocitelor în discocite. Pot apare şi forme ireversibile de echinocite, la eritrocitele îmbătrânite şi în cazuri patologice (boli sangvine).

d. Acantocitele – apar sub forma unor hematii rotunde care au pe suprafaţa lor 5-15 prelungiri inegale, ca nişte ţepi (*"acanthos"*), aşezate la distanţe inegale între ele. Sunt forme ireversibile şi apar în cazuri patologice, în ciroză sau anorexie nervoasă (fiind numite *"spurr cells"*).

e. Pe frotiu se pot observa şii forme intermediare, ca **sfero-stomatocite** sau **sfero-echinocite (Fig. 23).**

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

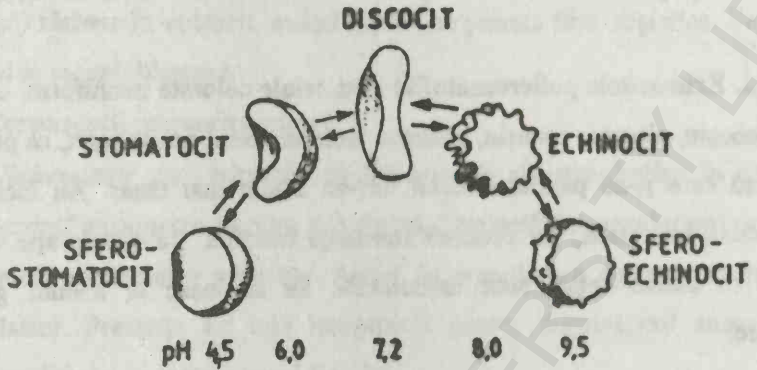


Fig. 23. Modificarea formei eritrocitelor în funcţie de pH (după Cotrutz şi col., 1994).

E] Anomalii de colorabilitate

În acest caz apar următoarele tipuri de eritrocite:

a. Eritrocitele hipocrome sunt slab colorate comparativ cu cele normale, fiind încărcate cu puţină hemoglobină. Se asociază aproape întotdeauna cu o microcitoză. Dintre eritrocitele hipocrome fac parte şi **anulocitele**, care au hemoglobina dispusă la periferie cu centrul necolorat, ceea ce dă aspectul de inel.

b. Eritrocitele hipercrome prezintă o coloraţie mai intensă decât cea normală, aşa cum se constată în megalocitoză, sferocitoză, macrocitoză. Aceasta nu se datoreşte însă unei concentraţii mai mari de hemoglobină (care nu poate depăşi 34%), ci creşterii grosimii celulei şi lipsei zonei centrale.

c. Eritrocitele bazofile au o culoare uşor albăstruie (la coloraţia May-Grünwald-Giemsa), având afinitate bazofilă, datorită persistenţei citoplasmei eritroblastului bazofil, care conţine ribonucleoproteine.

BCU MAIN CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

La coloraţia vitală cu albastru briliant de crezil, se constată că aceste celule conţin substaţă granulo-filamentoasă, fiind deci reticulocite. Se întâlnesc în anemii grave.

d. Eritrocitele policromatofile sunt celule colorate neuniform, cu nuanţe de roz-cenuşiu, albastru-cenuşiu, albastru-violaceu. Sunt celule mari, ce provin din eritroblaşti care şi-au pierdut nucleul într-un stadiu mai tânăr. Au încărcare în hemoglobină mai slabă, dar prezintă substanţă bazofilă. La o coloraţie vitală, se constată că aceste celule sunt reticulocite. Se întâlnesc în anemii grave cu regenerare.

e. Anizocromia reprezintă aspectul unui frotiu ce conţine atât eritrocite normocrome, cât şi eritrocite hipocrome.

F] Alte anomalii eritrocitare

a. Eritrocitele cu resturi nucleare sau citoplasmatice

- *Corpusculii Jolly* (*Howell Jolly*) sunt resturi de cromatină nucleară care se evidenţiază prin reacţia Feulgen pozitivă. Apar sub formă de corpusculi rotunzi, denşi, picnotici, cu diametrul de 1μm, de coloraţie azurofilă. Obişnuit, se află câte unul într-un eritrocit, rareori doi sau trei. Eritrocitele cu corpusculi Jolly au talie mare. Corpusculii Jolly provin din picnoza cromosomilor (condensarea şi micşorarea lor) care rămân în citoplasmă în cursul diviziunilor anormale, sub formă de micronuclei. Apar în anemii grave, megaloblastice (megaloblastoză).
- *Inelele Cabot* sunt formaţiuni filamentoase, subţiri cu formă de inel sau de cifra 8, în centrul sau la periferia celulelor, colorate în roşu-violaceu sau roşu-deschis (azurofile) prin metoda Feulgen. Totuşi, se consideră că aceste inele sunt resturi nucleare sau că provin din fibrele fusului mitotic, rămase neresorbite. Apar în anemiile grave din leucoze şi neoplasme.

- *Pulberea cromatiniană* reprezintă granulaţii azurofile (resturi de cromatină) rămase în eritrocit, având aspect de puncte fine, roşietice. Se întâlnesc în special în megaloblastoză.

b. Corpusculii intraeritrocitari

- *Siderocitele* sunt eritrocite cu 1-6 granule albastre-deschis în citoplasmă, care reprezintă depunerea fierului sub formă trivalentă (hemosiderina), evidenţiate prin tehnici histochimice adecvate. Astfel de granule pot apare şi în eritroblaste (sideroblaste). Prezenţa lor este importantă pentru diagnosticul anemiilor care implică modificări în metabolimul fierului.
- *Corpusculii Heinz* (*Ehrlich-Heinz*) sunt granule mici, sferice, în număr mic per celulă, aranjate periferic. Nu se colorează prin metoda May-Grünwald-Giemsa, ci numai cu coloranţi vitali (albastru de Nil, violet de metil, albastru briliant crezil). Apar în intoxicaţii methemoglobinizante şi indică prezenţa methemoglobinei şi a sulfhemoglobinei. Apariţia lor este favorizată de splenectomie.
- *Eritrocitele cu granulaţii (punctaţii) bazofile* prezintă granule mici, bazofile, inegale, deseori numeroase, colorate în albastru-violaceu prin metoda May-Grünwald-Giemsa, sau în albastru verzui, cu albastru de metilen. Apar în intoxicaţia cu plumb (saturnism), benzen, oxid de carbon, anilină, în anemii megaloblastice, în talasemie. Sunt favorizate de splenectomie.

1.3.2.11. Dozarea hemoglobinei prin metoda cu cianmethemoglobină (Kondi, 1981)

Principiu: În prezenţa reactivului Drabkin, ce conţine cianură de K şi fericianură de K, are loc liza eritrocitelor, iar hemoglobina (Hb) este transformată în cianmethemoglobină, ce se dozează spectrofotocolorimetric, la λ=540nm.

Reactivi:

- Soluţie Drabkin:

- fericianură de K ..... 0,200 g
- cianură de K ..... 0,050 g
- bicarbonat de Na ..... 1 g
- apă distilată..... până la 1.000 ml

Soluţia filtrată se poate păstra la rece, în flacoane brune, timp de 2 – 3 luni. Se manevrează cu atenţie, fiind toxică.

- Etalon de hemoglobină: soluţie de cianmethemoglobină 0,06g% conform etalonului internaţional (Centrul de Hematologie Bucureşti, etalon Kondi). Se poate păstra timp de 1 an, la 4^0C.

Materiale necesare: pipetă capilară de hemoglobină de 0,02ml (20µl); pipetă gradată de 5ml; spectrofotocolorimetru Spekol; eprubete de hemoliză.

Tehnica de lucru:

✓ se pun câte 5ml soluţie Drabkin în eprubete de hemoliză şi apoi câte 0,02ml sânge integral (proaspăt sau cu anticoagulant uscat Wintrobe sau EDTA);

✓ se agită şi se lasă în repaus 30 min., pentru hemoliză totală;

✓ se citeşte extincţia (E) la Spekol (λ=540nm) faţă de soluţia Drabkin şi apoi se calculează concentraţia de Hb.

Calculul concentraţiei. Se înmulţeşte valoarea E cu factorul F (ce reprezintă extincţia etalonului în funcţie de concentraţia lui) şi cu diluţia sângelui, egală cu 250 (0,02ml sânge în 5ml soluţie Drabkin) obţinându-se concentraţia de Hb, în g/100ml sânge:

$$\mathbf{Hb\ (g\%) = E \times F \times 250}$$

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Etalonarea aparatului şi stabilirea factorului F:

Se fac trei diluţii succesive din etalonul de hemoglobină folosind soluţia Drabkin pentru diluţie:

Soluţie etalon	Soluţie Drabkin	Concentraţie
C_1 = sol. Etalon nediluată	-	0,06g%
C_2 = 4,15 ml	0,85 ml	0,05g%
C_3 = 2,20 ml	1,70 ml	0,04g%

Se citeşte extinciţia (E) pentru fiecare concentraţie, faţă de soluţia Drabkin şi se stabileşte factorul (F):

$$F = \frac{C}{E}$$

Se calculează F mediu, împărţind suma celor trei F la 3. Valoarea lui F este specifică pentru fiecare aparat şi trebuie verificată periodic.

Alte procedee de calcul:

- Concentraţia Hb% se poate stabili şi pe baza unei curbe etalon obţinute cu soluţie standard de Hb, valoarea E citindu-se faţă de apă distilată sau faţă de soluţia Drabkin.
- Determinarea Hb% se poate realiza şi fără o soluţie standard, utilizându-se coeficientul molecular de extincţie al Hb (E Hb = 11 x 10^3), greutatea moleculară a Hb (M_{Hb} = 16.114), volumul de sânge luat în lucru (0,02ml) şi un factor de proporţionalitate (5,02):

$$\mathbf{Hb\% = \frac{E\ pr.x\ 16.114}{11.000} \times 10^{-1} \times \frac{5,02}{0,02}}$$

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Hb% = Epr. x 36,8

Coeficientul de 36,8 trebuie verificat pentru fiecare spectrofotometru, utilizând probe de sânge cu un conţinut de Hb precis determinat pe baza comparării cu un standard de cianmethemoglobină.

- Dozarea Hb pe baza conţinutului de Fe prin metoda Wong (după **Manta şi colab., 1976)**

Se măsoară E a unei soluţii standard de Fe ce conţine 0,1mg/ml şi a probei de analizat (λ=540nm) faţă de apă distilată şi se calculează:

mgFe/100ml sânge = Epr./Est. x 50

$$\textbf{Hb (mg/100ml sânge)} = \frac{\text{mg Fe / 100 ml sange}}{3{,}38}$$

Metoda este simplă şi destul de precisă.

Valori normale (la om): bărbaţi = 14 - 18g%; femei = 12 - 16g%, nou-născut = 18,0 - 27,0g%; copil de un an = 9,0 - 14,6g%; copii 9-13 ani = 10,8 - 15,4g%.

1.3.2.12. Hematocritul

În mod curent, hematocritul (Ht) este definit ca volumul procentual eritrocitar, reprezentând proporţia eritrocitelor din 100 ml sânge integral.

Principiu: Sângele recoltat pe anticoagulant uscat - EDTA, Wintrobe sau heparină (1 picătură la 5ml sânge) - se centrifughează, separându-se eritrocitele de plasmă şi se evaluează raportul procentual al volumelor lor.

Material:

Ht se poate determina prin două metode:

- Macrometoda Wintrobe, ce necesită o centrifiugă obişnuită şi tuburi de sticlă speciale, gradate sau negradate;

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- Micrometoda microhematocrit, ce necesită o centrifugă specială de mare turaţie (10.000 - 12.000 rpm) şi tubuşoare capilare heparinate.

Tehnica de lucru:

✓ pentru macrometodă, sângele recoltat cu anticoagulant uscat se introduce în tubul de Ht cu o pipetă Pasteur ce are ataşat un tub de cauciuc, apoi capetele tubului se închid bine cu dopuri de cauciuc, curate. Pentru micrometodă, tuburile se încarcă prin capilaritate şi apoi, un capăt se astupă bine cu un dop de plastilină;

✓ centrifugarea se realizează, pentru macrometodă la 3.000rpm, timp de 30min. sau la 4.000rpm, 20min., (până când volumul eritrocitelor nu mai scade). Pentru micrometodă, centrifugarea se face timp de câteva minute (2 min.) la centrifuga specială. Tuburile capilare trebuie să fie bine aşezate pe şanţurile platformei rotative a centrifugii, astfel încât să nu se mişte.

Calcul:

Pentru macrometodă, se citeşte meniscul inferior al coloanei de eritrocite separate prin centrifugare direct pe gradaţia tubului sau cu o riglă gradată (în mm). Se citeşte, de asemenea, lungimea totală a coloanei de sânge (plasmă şi eritrocite). Pentru microhematocrit, citirea se face pe o nomogramă standard.

Se notează: H - înălţimea totală a coloanei sangvine (100%); h - înălţimea coloanei de eritrocite şi Ht% - hematocrit şi se calculează:

$$Ht\% = \frac{h \times 100}{H}$$

Exemplu: H=50diviziuni; h=20diviziuni;

$$Ht\% = \frac{100 \times 20}{50} = \frac{200}{50} = 40\,\%.$$

Deci, în 100 ml sânge există 40ml eritrocite şi 60 ml plasmă.

Valori normale (la om): bărbaţi - 39% - 51%(media 44,93%); femei - 35,30% - 49% (media 40,7%); nou-născut - 54 %; copii - 38%.

Variaţii: valori normale în normocitemie (cu volum total de sânge normal sau modificat la hemoragii sau datorită unor afecţiuni – hipovolemie ori hipervolemie); valori scăzute în oligocitemie (anemii, ciroze, după perfuzii); valori crescute în policitemie (normală la altitudine, cu normovolemie, anormală în deshidratare, şoc, poliglobulii patologice).

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

2. MICROSCOPIA ELECTRONICĂ

2.1.Caracterizare generală şi formarea imaginilor în microscopia electronică

Fizicianul francez **Louis de Broglie** a arătat, în 1924, că electronii au proprietăţi ondulatorii ca şi fotonii, fiindu-le asociată o undă, conform mecanicii ondulatorii. Astfel, radiaţiile electronice se aseamănă cu cele luminoase.

Lungimea de undă (λ) are o valoare medie de 400-550nm pentru lumina vizibilă, 200-340nm pentru lumina UV, iar pentru fluxul de electroni valoarea acesteia este dată de formula lui **De Broglie**:

$$\lambda = \frac{12,3}{\sqrt{E}} \text{ (în Å) unde,}$$

- E este voltajul de accelerare a electronilor.

Formula se mai poate scrie:

$$\lambda = \frac{h}{mv} \text{ unde,}$$

- h = constanta lui Planck ($6,62 \times 10^{-34}$J.s.; cuantifică energia);
- v =viteza electronului; m = masa electronului (conform mecanicii ondulatorii).

Puterea de rezoluţie în microscoapia electronică se calculează după aceeaşi formulă ca şi în microscopia fotonică $\left(D_0 = \frac{0,61\lambda}{n \cdot \sin\alpha}\right)$ şi este de 0,3 µm fără

BCU IASI-CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

imersie, 0,2 μm cu imersie şi 0,1 μm în UV, realizându-se o putere de mărire între 500x şi 2000x (la obiectiv o mărire de 100-140x şi la ocular o mărire de 5-15x).

Microscopul electronic realizează o *putere de mărire* mult mai ridicată decât microscopul fotonic, derivată din tensiunea de accelerare a electronilor (care, cu cât este mai mare, cu atât determină o lungime de undă mai mică).

Principiul microscopului electronic constă în observarea preparatului cu ajutorul unui flux de electroni, accelerat cu o anumită tensiune de accelerare, folosindu-se bobine electromagnetice ("lentile magnetice") în locul lentilelor de sticlă de la microscopul fotonic (**Fig.24** şi **Fig.25**).

Fluxul de electroni este generat de filamentul (*catodul*) tunului electronic şi trece printr-o bobină electromagnetică ce are rolul unui *condensor*, concentrând electronii în direcţia preparatului. Există, de asemenea, o altă bobină electromagnetică, ce îndeplineşte funcţia *lentilei obiectivului*, prin care se obţine o imagine mărită a preparatului. O altă bobină electromagnetică funcţionează ca ocular sau *lentilă de proiecţie*, determinând o mărire suplimentară a imaginilor.

Imaginea nu se poate vedea direct, ci este vizualizată pe o *placă fluorescentă* (care devine fluorescentă la bombardarea cu electroni) sau pe o *placă fotografică*.

Lungimea de undă a fluxului de electroni ce străbate tubul microscopului este invers proporţională cu *masa şi viteza electronilor*, la rândul lor proporţionale cu *viteza de accelerație*, dependentă de tensiunea de accelerare. Tensiunea de accelerare a electronilor se calculează după formula lui **De Broglie** (menţionată anterior). De exemplu, la o tensiune de accelerare de 50.000 de volţi (50KV), lungimea de undă este de 0,053Å, iar rezoluţia calculată este de 2-5Å. În practică ea este de circa 10Å, datorită aberaţiilor generate de lentilele magnetice precum şi aperturii mult mai mici decât cea a microscopului fotonic.

BCU "ALEXANDRU IOAN CUZA" LIBRARY

Puterea de mărire directă a microscopului electronic este de 20.000x (100x la obiectiv şi 200x la bobina proiectoare), ajungând la 100.000x - 200.000x prin bobine intermediare. Prin fotografiere, imaginea poate fi mărită de 1.000.000x.

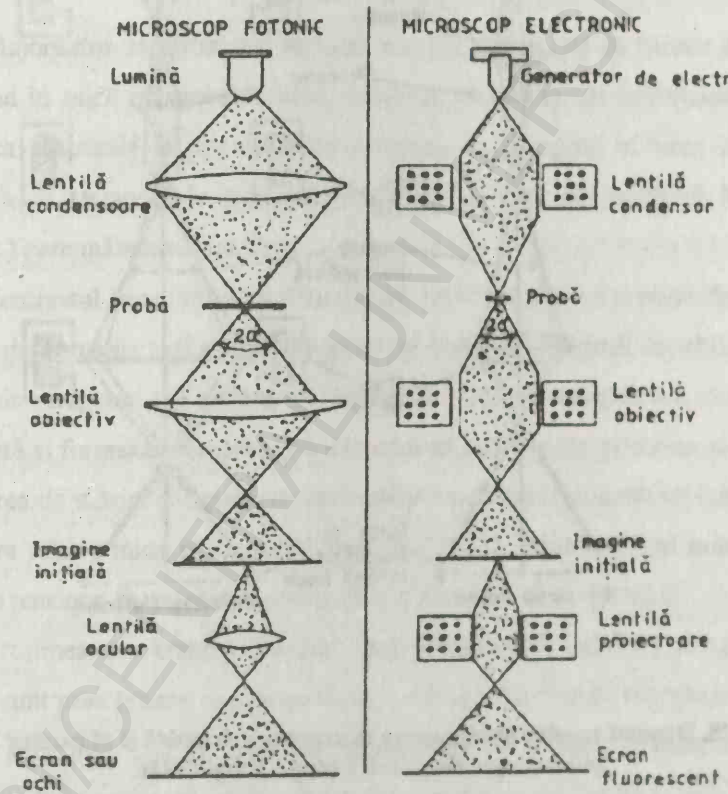


Fig.24. Comparaţie între realizarea imaginilor în microscopia fotonică şi cea electronică (după Cotrutz şi colab., 1994)

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

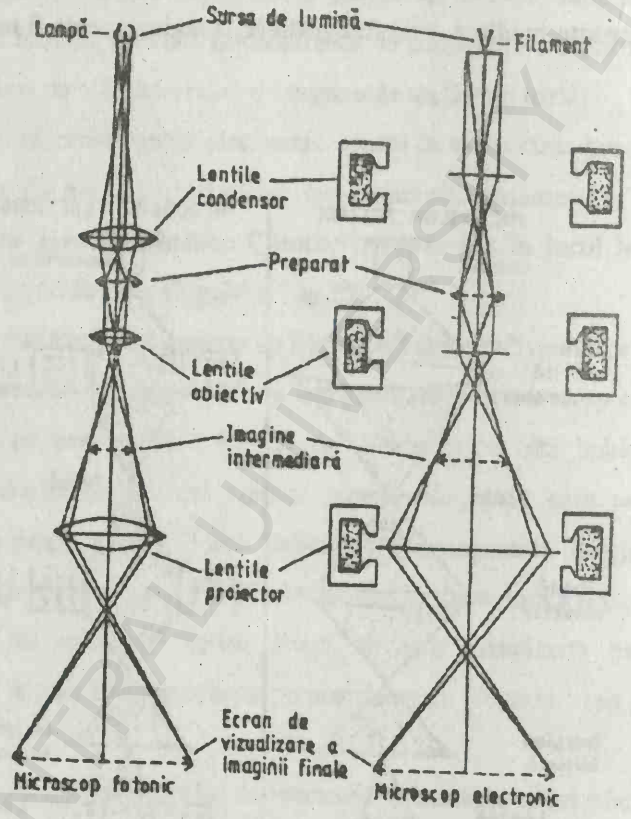


Fig. 25. Drumul razelor luminoase în microscopia fotonică şi al razelor X în microscopia electronică (după Karp 1984).

Funcţionarea normală a microcopului electronic este asigurată printr-un vid înalt, de ordinul a 10^{-4}nim Hg, care previne oxidarea filamentului, descărcările în gaze şi împrăştierea electronilor. Pentru a crea acest vid se foloseşte o pompă mecanică, pentru vid preliminar şi o pompă de difuzie pentru vidul înalt.

BCU IASI CENTRALA UNIVERSITY LIBRARY

Formarea imaginii

În microscopia electronică, formarea imaginii apare ca rezultat al dispersiei electronilor de către preparatul studiat, determinată de mai multe cauze. Dispersia electronilor este dată în principal, de *grosimea* şi *densitatea moleculară a preparatului* şi în special de *natura* şi *numărul atomic* (Z) al atomilor din compoziţia sa. Cu cât numărul atomic este mai mare, cu atât dispersia este mai mare.

Majoritatea atomilor din materia vie (C, O, H, N) au număr atomic mic influenţând în mică măsură formarea imaginii. De aceea, pentru vizualizare, este necesar ca secţiunile să fie *colorate* (tratate) cu compuşi ai unor atomi grei, electronodenşi (tetraoxid de osmiu, acid fosfotungstic, acetat de uranil, hidroxid de plumb etc.) care măresc contrastul.

Contrastul imaginii se realizează datorită faptului că o parte din electroni (cu unghi de dispersie mai mare), ies în afara fantei de apertură, iar alţii, (cu unghi de dispersie mic, deci cei nedeviaţi), străbat diafragma de apertură, cad pe placa fluorescentă şi formează imaginea. Contrastul se poate regla printr-un raport optim între puterea de mărire şi tensiunea de accelerare. Astfel, un contrast bun se obţine la o mărire relativ mică şi un voltaj mic (40.000V). Pentru măriri puternice este necesară o tensiune de accelerare mare, şi o diafragmă de câmp mică.

Grosimea preparatelor (secţiunilor) influenţează calitatea imaginii. Dacă secţiunile sunt prea groase, imaginea devine neclară (contururi suprapuse), iar dacă secţiunile sunt prea subţiri, devierea electronilor este mică şi imaginea nu are contrast. Limitele optime ale grosimii secţiunilor sunt cuprinse între 100-300Å.

BCU MS CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

2.2. Tipuri de microscoape electronice

Microscopul electronic este un instrument foarte util pentru studiul structurilor submicroscopice şi al constituenţilor moleculari celulari. Astfel, el prezintă o serie de avantaje faţă de alte mijloace de investigaţie, cel mai important fiind marea sa putere de rezoluţie. Microscopia electronică prezintă însă o serie de dificultăţi tehnice şi limitări, cum ar fi:

- ✓ puterea de penetraţie slabă a electronilor - care impune utilizarea unor secţiuni ultrafine şi depunerea preparatului pe un film de colodiu (sau alt material) foarte subţire (50-100Å) care se montează pe o grilă metalică fină;
- ✓ utilizarea vidului – ce nu permite observarea directă a celulelor vii. În consecinţă, preparatele trebuie fixate, deshidratate şi colorate, operaţii care pot modifica structurile celulare;
- ✓ bombardamentul cu electroni poate determina alterări structurale şi biochimice ale preparatului.

Aceste impedimente pot fi însă înlăturate sau atenuate, prin utilizarea unor tehnici adecvate de prelucrare a materialului biologic şi a unor tipuri variate de microscoape electronice.

Există mai multe tipuri de microscoape electronice, diferite după aspectele lor constructive şi destinaţia lor.

2.2.1. Microscopul electronic de transmisie (Transmission Electron Microscope, TEM)

Microscopia electronică de transmisie se bazează pe interacţiunea câmpurilor electromagnetice generate de bobine cu proba şi pe interacţiunile specifice dintre structura probei şi electronii care o străbat.

BCU IAŞI CENTRALA UNIVERSITARĂ LIBRARY

TEM se utilizează pentru studiul ultrastructurilor celulare.

În funcție de tensiunea de accelerare, există două tipuri de microscoape electronice de transmisie:

- **microscopul electronic de transmisie convențional (CTEM)** ce utilizează în mod curent tensiuni de 80KV-200KV;
- **microscop electronic de voltaj înalt (HVEM)** la care se folosesc tensiuni înalte de accelerare de peste 3.000KV (3MV)

2.2.1.1. Microscopul electronic de transmisie convențional (Conventional Transmission Electron Microscope - CTEM)

Microscopul electronic de transmisie convențional este format din următoarele părți componente principale: **sistemul electronooptic, sistemul electronic, consola de comandă și sistemul de vid (Fig. 26).**

A] Sistemul electronooptic

Formarea imaginii la CTEM este similară cu cea de la microscopul fotonic. Pentru aceasta este necesară o sursă de radiații de natură electromagnetică la ambele tipuri de microscoape, dar la cel electronic se folosesc radiații X, cu lungime de undă (λ) mult mai mică decât cea a radiației vizibile, care în domeniul verde are λ de 5.500Å (550nm). Astfel, razele X au λ între 0,1 - 0,01Å, permițând evidențierea unor structuri de ordinul unui Ångström, deci la nivel atomic.

Acest sistem asigură formarea imaginii și cuprinde sistemul de iluminare, camera pentru preparat, sistemul de formare a imaginii, camera de observare și camera fotografică.

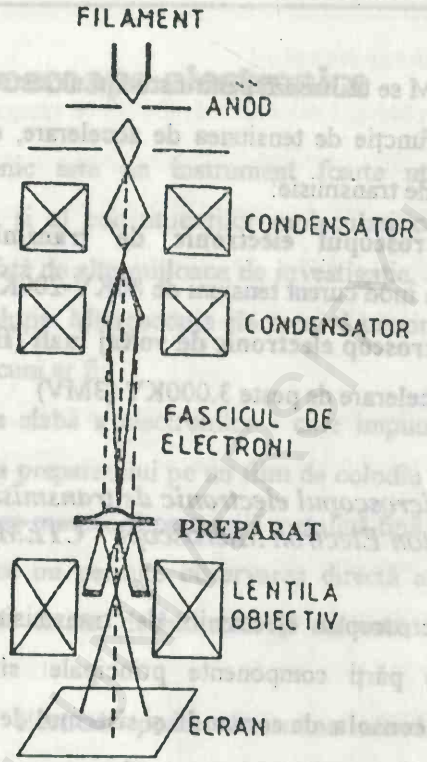


Fig. 26. Schema microscopului electronic de transmisie (TEM) (după Cotrutz şi col., 1994)

a. Sistemul de iluminare electronooptic este format din **tunul electronic** şi **lentilele condensor**. Are rolul de a asigura strălucirea optimă necesară observării preparatului.

- **Tunul electronic** reprezintă partea superioară a coloanei microscopului şi cuprinde: *sistemul catod-filament, cilindrul Wehnelt* şi *anodul*.

Filamentul are rol de catod, fiind sursa de radiaţii X. În funcţie de tipul filamentului, există mai multe variante de tunuri electronice: cu filament de

wolfram în formă de V, cu filament de wolfram punctiform, cu filament de hexaborură de lantan (LaB_6), cu emisie de câmp, cu emisie de câmp şi răcire.

Filamentul este adus la incandescenţă (2.800°C) şi emite ioni (emisie termoionică). El reprezintă tipul de catod cald folosit la majoritatea microscoapelor electronice. Există şi un tip de catod rece, mai rar folosit, reprezentat de o suprafaţă metalică, din care se eliberează electroni sub influenţa unei diferenţe de potenţial dintre catod şi anod. Cu cât suprafaţa de emisie este mai redusă, cu atât fasciculul de electroni este mai omogen şi iluminarea preparatului mai puternică. Astfel, la tunul cu filament în V suprafaţa este mai mare decât la cel cu emisie de câmp, la care strălucirea creşte de 10.000 de ori, ceea ce duce la creşterea claritătii şi rezoluţiei imaginii, până la 2Å.

Cilindrul Wehnelt este un electrod cu aspectul unui capac cilindric, cu rol de focalizare a electronilor. Are partea bazală închisă, prevăzută cu o apertură circulară cu diametrul de 1,5mm, în care se centrează filamentul şi prin care trece fluxul de electroni. Este conectat direct la tensiunea înaltă, negativă.

Anodul este un disc metalic cu un orificiu central de 3-5mm, cu rolul de a dirija electronii în axul optic al coloanei microscopului. Între catod şi anod se aplică tensiunea înaltă de accelerare a electronilor necesară traversării secţiunilor preparatului.

- Lentilele condensor reprezintă un ansamblu de două lentile electromagnetice, una cu distanţă focală mică, determinând o imagine micşorată a sursei de electroni (filamentului), iar a doua cu distanţă focală mare, transferând imaginea micşorată în planul obiectului. Cele două lentile au rolul de a focaliza fasciculul electronic pe probă, iluminând-o foarte puternic, în vederea unei bune claritătii.

BCU IASI CENTRALA UNIVERSITARA LIBRARY

Pentru compensarea aberaţiilor optice, la lentilele condensoare se asociază un sistem de corectare şi compensare, format din: *stigmator* ce corectează astigmatismul lentilelor, *compensor* care asigură focalizarea imaginii şi *deflector*, care reglează distanţa dintre obiectiv şi lentila condensor 2 şi aliniază fasciculul între condensatorul 2 şi sistemul de formare a imaginii, permiţând studii în câmp întunecat.

b. **Camera probei** cuprinde spaţiul din coloana microscopului, dintre lentilele condensator şi lentilele de formare a imaginii şi este mărginită de două diafragme. Accesul în camera probei se face printr-o cameră-ecluză, cu rol de adaptare a presiunii. Secţiunile probei sunt fixate pe o grilă şi se manipulează în cameră şi în afara ei cu ajutorul unui portobiect. Fluxul de electroni cade perpendicular pe secţiune, pe toată grosimea ei, având loc difracţia razelor X. La trecerea prin secţiune, fluxul de raze, iniţial omogen, este modulat, conform caracteristicilor morfostructurale ale probei, care sunt apoi vizualizate pe ecranul fluorescent.

c. **Sistemul de formare a imaginii** cuprinde mai multe lentile electromagnetice: *obiectiv, intermediară* şi *proiector*. Reglarea distanţei focale a sistemului pentru vizualizarea detaliilor din grosimea secţiunii se realizează prin modificarea curentului ce străbate circuitul bobinelor (lentilele electromagnetice).

d. **Camera de observare** se află în partea inferioară a microscopului, la nivelul panoului cu dispozitivele de comandă, având trei ferestre de vizualizare a imaginii. Camera este în legătură cu lentila proiector, în partea superioară şi cu caseta fotografică, în partea inferioară. Pentru vizualizarea imaginii, camera de observare conţine în interior un ecran format dintr-o placă metalică acoperită cu o substanţă fluorescentă (de exemplu microcristale de sulfură de zinc şi cadmiu)

e. **Camera fotografică** se află sub camera de observare şi conţine o casetă cu un set de plăci fotografice (12 sau 24, 6/9cm) acoperite cu o emulsie sensibilă la

razele X. Această cameră este în legătură directă cu coloana microscopului şi are un sistem de vidare. Datorită camerei fotografice, este posibilă stocarea imaginilor, mărirea şi prelucrarea lor, în vederea studierii diferitelor structuri.

B] Sistemul electronic şi consola de comandă

Cuprinde:

a. Sistemul electronic este constituit din două blocuri: *blocul generator de înaltă tensiune*, necesară obţinerii unei bune rezoluţii (sub 10Å) şi *blocul de alimentare al circuitului lentilelor şi al sistemului de vid*, ce asigură un curent bine stabilizat, necesar pentru alimentarea lentilelor şi înlăturarea aberaţiilor lor.

b. Consola de comandă este situată pe panoul frontal şi este reprezentată de dispozitivele electronice de pornire-reglare şi control, ce asigură accesarea luminii, rezoluţia, claritatea şi stabilitatea imaginii. Pentru o rezoluţie sub 10Å, stabilitatea voltajului trebuie să fie de $2x10^{-6}$V/min., iar stabilitatea curentului lentilei obiectiv de $2,5x10^{-5} - 2x10^{-6}$Å/min.

C] Sistemul de vid

În coloana microscopului se realizează un vid înalt (în medie de 10^{-4}-10^{-6} torr), necesar pentru înlăturarea interacţiunilor dintre razele X şi moleculele de aer, ceea ce asigură obţinerea unui fascicul coerent şi rectiliniu de electroni, centrat pe ecranul fluorescent. Sistemul de vidare este reprezentat de *1-2 pompe rotative de vid preliminar* şi *o pompă de difuzie pentru vid înalt*, necesar unei bune rezoluţii a microscopului. Pentru manevrarea şi protecţia sistemului, acesta este prevăzut cu o serie de dispozitive şi supape manuale şi automate.

2.2.1.2. Microscopul electronic cu voltaj înalt (Highî Voltage Electron Microscope - HVEM)

Microscopul electronic cu voltaj înalt (supraînalt) este o variantă a microscopului electronic, care foloseşte o tensiune înaltă de accelerare a electronilor (300 KV, până la 3-5 MV). Este utilizat pentru studiul ultrastructurilor
la nivel molecular (citoschelet, cromosomi, acizi nucleici, enzime, structuri moleculare tridimensionale).

Această generaţie de microscoape electronice a fost creată în 1960, când **Dupony şi Perrier** au realizat primul microscop electronic (cu o tensiune de accelerare de 1 MV – un milion de volţi), în Laboratorul de optică electronică din Toulouse.

Un astfel de microscop prezintă o mare complexitate, având totodată şi un preţ ridicat de cost. El conferă însă numeroase avantaje, deoarece permite trecerea fluxului de electroni prin preparate cu grosimi mai mari (de exemplu 14μm), secţionate chiar la un microtom obişnuit şi care nu sunt colorate. Se pot studia, de asemenea, celule întregi, fără includerea lor şi se poate realiza uşor reconstituirea tridimensională a ultrastructurilor celulare; se pot evidenţia enzimele celulare, moleculele de acizi nucleici, comportamentul cromozomilor în meioză. Se pot obţine şi fotografii de mare fidelitate, care asigură şi mărirea considerabilă a imaginilor.

Principiul de construcţie al HVEM este asemănător cu cel al TEM convenţional. Realizarea tensiunii ridicate necesită însă, o coloană mult mai înaltă, de dimensiunea unei clădiri cu trei etaje. De asemenea, în coloană apar vibraţii, a

căror înlăturare necesită o fundație de mare stabilitate. Lentilele electromagnetice sunt mai puternice decât la CTEM, iar curentul absorbit de ele și de sistemul de accelerare a fluxului electronic necesită utilizarea unor blocuri de alimentare electrică deosebit de performante.

Tot ansamblul impune măsuri de securitate sporite, pentru funcționarea lui normală și pentru evitarea iradierii personalului.

2.2.2. Microscopul electronic analitic de transmisie (Transmission Electron Analytical Microscope - TEAM)

Acest tip de microscop este constituit din două sisteme electronice: un *microscop electronic de transmisie de înaltă rezoluție* și un *sistem analitic* reprezentat de un spectrofotometru microanalizor de raze X. Având această componență, TEAM permite atât studiul aspectelor morfostructurale ale preparatului, cât și obținerea de informații asupra elementelor chimice din structura acestuia. Este utilizat pentru studii ultrastructurale și analitice, simultane.

Principiul de funcționare al TEAM are la bază analiza lungimii de undă a radiației dispersate sau a energiei dispersate de către elementele chimice din structura preparatului. Astfel, la bombardarea unui preparat cu un fascicul de electroni, are loc o emisie de raze X cu lungimi de undă caracteristice atomilor bombardați. Aceste lungimi de undă sunt măsurate cu ajutorul spectrofotometrului, ceea ce permite determinarea compoziției chimice elementare a unor cantități foarte mici de probă de analizat.

TEAM constituie un instrument de cercetare foarte util în diverse domenii:

- ✓ determinarea și repartiția elementelor chimice din structura normală a unor țesuturi (în special Na^+ și K^+);

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

✓ evidenţierea unor elemente chimice implicate în anumite stări patologice: intoxicaţiile, afecţiunile cardiovasculare, carenţele fiziologice;

✓ studiul distribuţiei unor elemente poluante în cadrul lanţului trofic;

✓ evidenţierea unor reacţii chimice la nivel celular pe baza analizei unor precipitate tisulare ce rezultă din aceste reacţii etc.

2.2.3. Microscopul electronic de baleiaj (Scanning Electron Microscope - SEM)

Primul microscop de acest tip a fost creat în 1935, de către **Max Knoll**.

Microscoapele de tip SEM, spre deosebire de cele cu transmisie (TEM), scanează suprafaţa obiectelor cercetate, redând imaginea tridimensională a acestora şi permit examinarea unor preparate cu dimensiuni mult mai mari (de câţiva centimetri diametru şi 1cm grosime). Ele nu pot furniza însă detalii morfo-structurale din grosimea preparatelor, fluxul de electroni nestrăbătând materialul examinat. Sunt utilizate pentru studiul ultramorfologiei suprafeţelor preparatelor (relieful geometric), prin intermediul electronilor secundari sau reflectaţi.

Formarea imaginii (**Fig. 27**) se realizează pe baza emisiei de electroni secundari, *reflectaţi* în urma bombardării probei de către fasciculul de electroni ce traversează preparatul. Pe ecranul fluorescent al microscopului se formează imaginea preparatului, care poate fi apoi fotografiată. În sistemul SEM, fasciculul de electroni este mai întâi îngustat la maximum, cu ajutorul a două-trei lentile electromagnetice (sub 100 Å), fiind apoi proiectat pe aparat.

Fasciculul primar de electroni astfel focalizat, este determinat să efectueze o mişcare în zig-zag ("raster") pe suprafaţa preparatului, prin intermediul a două bobine de deflexie din interiorul ultimei lentile electromagnetice, realizând o

"măturare" (baleiere) a acesteia. Imaginea suprafeţei apare pe ecranul tubului catodic, la scara dorită.

Acest fascicul explorator se află, în diferite momente, în puncte diferite ale suprafeţei preparatului. Impactul fasciculului primar de electroni cu preparatul generează în preparat o serie de semnale ce se manifestă prin apariţia de electroni secundari.

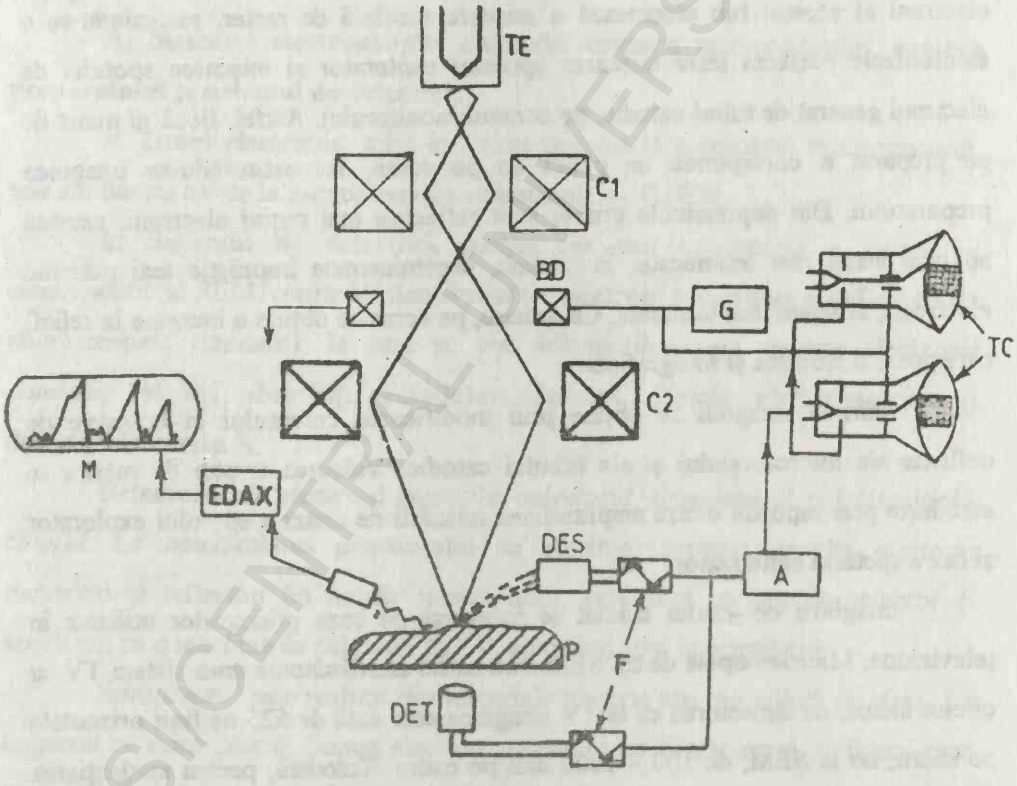


Fig. 27. Schema constructivă a microscopului electronic de baleiaj (SEM): TE - tun electronic; C1, C2, - lentile condensor; BD- bobină de deflexie (baleiaj); P -preparat; DET - detector de electroni transmişi; DES – detector de electroni secundari; EDAX – detector de raze X; G – generator de baleiaj; M - monitor TV; F -fotomultiplicator; TC - tuburi catodice pentru afişarea imaginii (după Isac şi colab., 1996)

BCU "SI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Spre deosebire de TEM, SEM are în componenţa sa un *detector al electronilor secundari*, care captează curentul produs de aceşti electroni, îl modulează (amplifică) şi îl trimite la blocul de baleiere al unui tub catodic al monitorului. Generatorul de baleiaj trimite un curent sub formă de dinte de fierăstrău în bobinele de deflexie ale microscopului, pentru generarea mişcării în zig-zag (raster) a fasciculului de electroni pe preparat; concomitent el trimite un curent identic în bobina de deflexie a tubului catodic, astfel încât fasciculul de electroni al acestui tub efectuează o mişcare similară de raster, realizându-se o sincronizare perfectă între mişcarea spotului explorator şi mişcarea spotului de electroni generat de tubul catodic, pe ecranul monitorului. Astfel, fiecărui punct de pe preparat îi corespunde un punct de pe ecran, reconstituindu-se imaginea preparatului. Din depresiunile probei sunt reflectaţi mai puţini electroni, acestea apărând astfel mai întunecate. În schimb, proeminenţele împrăştie mai puternic electronii, apărând mai luminate. Ca urmare, pe ecran se obţine o imagine în relief, care poate fi studiată şi fotografiată.

Mărirea imaginii se obţine prin modificarea curentului în bobinele de deflexie ale microscopului şi ale tubului catodic. Valoarea treptei de mărire se stabileşte prin raportul dintre amplitudinea mişcării de raster a spotului explorator şi cea a spotului sintetizator.

Imaginea obiectului studiat se formează pe baza principiilor utilizate în televiziune. Microscoapele de tip SEM sunt astfel asemănătoare unui sistem TV cu circuit închis, cu deosebirea că la TV imaginea este dată de 525 de linii orizontale pe cadru, iar la SEM, de 100 – 1000 linii pe cadru. Totodată, pentru evidenţierea unor detalii de înaltă rezoluţie, la SEM se foloseşte un fascicul fin de electroni, sub formă de spot, iar mişcările de raster sunt mai lente, întrucât numărul de electroni secundari generaţi de fiecare punct al preparatului depinde de durata trecerii spotului peste fiecare punct.

BCU IAŞI CENTRUL UNIVERSITAR LIBRARY

În general, microscoapele de tip SEM au o putere de mărire de până la 300.000x şi o rezoluţie cuprinsă între 750Å şi 40Å. Cele echipate cu tun de emisie de câmp au însă o rezoluţie mult mai bună (2Å), permiţând chiar vizualizarea atomilor de uraniu.

Microscoapele electronice de baleiaj sunt constituite din trei unităţi funcţionale: **sistemul electronooptic, sistemul de vid şi sistemul de operare şi afişaj.**

A] Sistemul electronooptic cuprinde: **coloana microscopului, camera preparatului şi sistemul de detectori.**

a. Tunul electronic, aflat în partea superioară a coloanei microscopului, este similar cu cel de la microscoapele cu transmisie - CTEM.

b. Sistemul de detectori, partea cea mai importantă a sistemului electronoptic al SEM, cuprinde: **detectorul de electroni secundari şi reflectaţi** (la microscoapele standard); la care se pot adăuga **detectori pentru electronii transmişi şi cei absorbiţi, catodoluminiscenţă, forţele electromotrice şi detectorul de raze X.**

Detectorul de electroni cuprinde: *colectorul, scintilatorul* şi *fotomultiplicatorul*. La bombardarea preparatului cu electroni primari, rezultă electroni secundari şi reflectaţi (în număr relativ mic), care sunt captaţi de colector şi accelerati cu o tensiune de cel puţin 10KV, ajungând apoi la scintilator.

Scintilatorul este realizat din materiale plastice sau din silicat de ytriu. La impactul cu scintilatorul, fiecare electron generează un număr mare de fotoni care sunt dirijaţi spre *fotomultiplicator*. Aici, fiecare fotoelectron generează un număr imens de electroni secundari (multiplicare) care sunt dirijaţi spre tubul catodic al monitorului, unde sunt folosiţi pentru modularea fasciculului electronic al acestuia.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

B] Sistemul de vid de la SEM este similar celui de la microscoapele de tip TEM.

C] Sistemul de operare şi afişaj

a. Sistemul de operare cuprinde: *alimentarea de la reţea* a circuitelor lentilelor (printr-o serie de stabilizatori de tensiune şi curent), *circuitul de voltaj înalt*, cel *de încălzire a filamentului* şi *circuitele de vid*, toate similare cu cele de la TEM.

b. Sistemul de afişaj cuprinde: *etajele de amplificare video*, *circuitele de baleiaj* (verticale şi orizontale), *tuburile catodice pentru vizualizarea imaginii*, *dispozitivele de focalizare şi mărire* a acesteia, *aparatura de fotografiere* a imaginii.

Microscoapele electronice de baleiaj permit obţinerea de informaţii privitoare la aspectul suprafeţei unui preparat, forma lui spaţială, precum şi proprietăţile lui fizice şi chimice.

Pregătirea probelor în vederea investigării cu ajutorul microscopului de tip SEM este în general, mai simplă decât în cazul microscoapelor de tip TEM, nefiind necesare secţiuni ultrafine. Pregătirea cere însă îndeplinirea condiţiei ca suprafaţa probelor să fie electroconducătoare, pentru a se evita acumularea de sarcini electrice pe suprafaţă. Pentru analize calitative, probele sunt secţionate şi polizate mecanic sau chimic. Pentru studii morfostructurale de suprafaţă şi compoziţionale, probele trebuie pregătite în mod adecvat.

Probele neconducătoare se acoperă cu un strat fin (cu o grosime de ordinul Å) dintr-o anumită substanţă depusă prin evaporare în vid. Acest strat realizează neutralitatea electrică a suprafeţei cerută de condiţiile specifice ale microscopiei de baleiaj.

Pentru ca probele cu suprafaţa rugoasă să fie acoperite cu un strat uniform, acestea sunt rotite pe toată durata depunerii. Pentru acoperire se utilizează un

colorant pe bază de argint coloidal, iar pentru îmbunătățirea observării se pot depune straturi succesive de Au şi Pd, cu condiția ca grosimea totală să nu depăşească 1.000Å. Probele biologice care conțin apă şi lichide volatile, ce se pot evapora în timpul baleierii datorită vidului din coloană, trebuie să fie în prealabil deshidratate sau înghețate, pentru înlăturarea efectelor negative (ca şi în cazul TEM).

2.2.4. Microscopul electronic de transmisie şi baleiaj (Scanning Transmission Electron Microscope -STEM)

După cum indică şi denumirea sa, acest tip de microscop este o combinație între un microscop de tip CTEM şi unul de tip SEM (**Fig. 28**).

Având caracteristici mixte, acest tip de microscop permite analize multiple, pe preparate cu o grosime de 1μm. Se pot obține astfel informații specifice celor două componente ale instalației: *imagine de transmisie*, cu o rezoluție de 4,5Å; *imagine de baleiaj cu electroni secundari sau reflectați*, cu o rezoluție de100-50Å; *imagine de baleiaj cu electroni transmişi*, cu o rezoluție de 30Å şi *imagine de difracție* a unei zone a preparatului studiat prin baleiaj.

STEM este utilizat pentru studiul ultrastructurilor prin transmisia electronilor şi al suprafețelor prin electroni secundari sau reflectați.

Selectarea tipurilor de imagine se realizează cu ajutorul unui comutator de pe consola de comandă.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

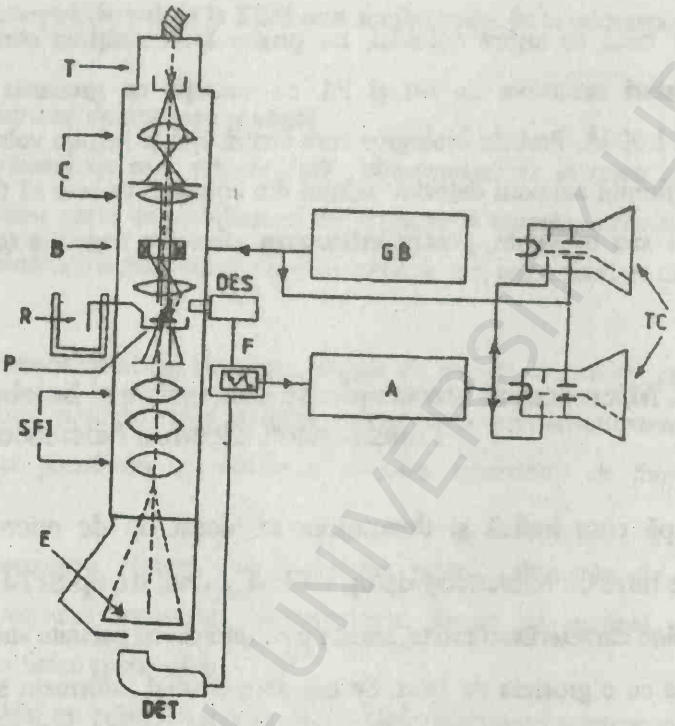


Fig. 28. Schema funcțională a microscopului electronic de transmisie și baleiaj (STEM): T- tun electronic; C - lentile condensator; DES - detector de electroni secundari și/sau reflectați; B - bobină de baleiaj; R - dispozitiv de răcire pentru preparat; P - preparat; SFI - sistem de formare a imaginii; E - ecran fluorescent; F - fotomultiplicator; DET - detector de electroni transmiși; GB - generator de baleiaj; A - amplificator; TC - tuburi catodice pentru afișarea imaginii (după Isac și col., 1994).

2.2.5. Microsonda electronică (Electron Probe Instrument -EPI)

Microscopul electronic permite investigarea structurilor subcelulare, dar nu poate da informații despre compoziția în elemente chimice a structurilor analizate.

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Pentru astfel de investigaţii, microscopia electronică a fost asociată cu spectrofotometria cu radiaţii X, realizându-se **microsonda electronică (Fig.29)**. Aceasta permite analize chimice elementare şi studiul suprafeţelor.

La bombardarea cu electroni a unei anumite zone din materialul biologic studiat, elementele chimice din structura acestuia emit radiaţii X, cu lungimi de undă caracteristice fiecărui element. Radiaţiile cu anumite lungimi de undă, caracteristice atomilor din probă, pot fi selectate cu ajutorul unui spetrometru de raze X, putându-se stabili astfel natura chimică a elementelor din proba studiată.

Microsonda electronică permite microanaliza unor zone intracelulare submicroscopice, cu ajutorul unui fascicul de electroni cu un diametru de 0,1-1μm, putându-se astfel studia probe cu grosimi de 0,05μm.

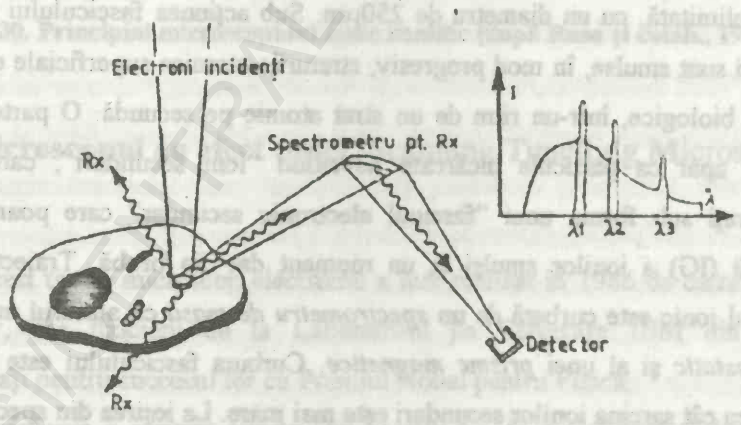


Fig. 29. Principiul microsondei electronice (stânga) şi spectrul de radiaţii X emise de probă (dreapta) (după Rusu şi colab., 1988).

2.2.6. Microscopul ionic analitic

Microsonda electronică a fost asociată cu microscopia ionică analitică, realizându-se o metodă mixtă de analiză a probelor biologice, denumită **microanaliza nucleară.**

Microscopia ionică analitică este o metodă de mare sensibilitate, ce permite precizarea distribuţiei microscopice a unui element chimic din constituţia unei probe biologice, în concentraţii extrem de mici (de ex. aluminiul, sub 0,1ppm/ μm^3), sensibilitatea metodei fiind de 1.000 de ori mai mare decât a microsondei electronice.

Microscopul ionic analitic **(Fig.30)** se bazează pe principiul bombardării suprafeţei unei secţiuni histologice cu un fascicul de "electroni primari", pe o zonă bine delimitată, cu un diametru de 250μm. Sub acţiunea fasciculului de electroni primari sunt smulse, în mod progresiv, straturile atomice superficiale din structura probei biologice, într-un ritm de un strat atomic pe secundă. O parte din atomii smulşi apar ca particule încărcate devenind "ioni secundari", care apoi sunt accelerați sub forma unui "fascicul electronic secundar" care poartă imaginea globală (IG) a ionilor smulşi la un moment dat din probă. Traiectoria acestui fascicul ionic este curbată de un *spectrometru de masă* cu ajutorul unui *deflector electrostatic* şi al unei *prisme magnetice*. Curbura fasciculului este cu atât mai mare cu cât sarcina ionilor secundari este mai mare. La ieşirea din spectrometrul de masă, fasciculul ionic este separat într-un număr de fascicule egal cu numărul tipurilor (speciilor) de ioni. Fasciculul ionului studiat poate fi separat şi dirijat spre un ecran fluorescent pe care se proiectează *imaginea analitică* a distribuţiei ionului în structura studiată.

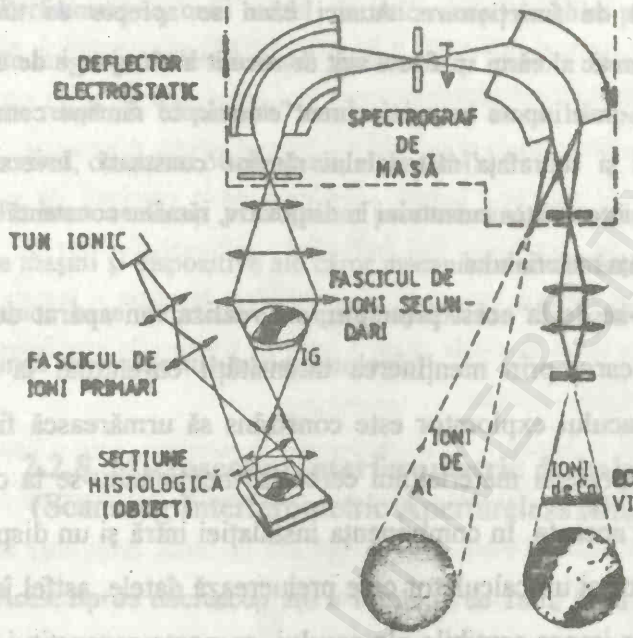


Fig. 30. Principiul microscopului ionic analitic (după Rusu şi colab., 1988)

2.2.7. Microscopul cu efect tunel (Scanning Tunelling Microscope - STM)

Acest tip de microscop electronic a fost realizat în 1986 de către **Binning** şi **Rohrer**, doi fizicieni de la Laboratorul de Cercetare IBM din Zürich, recompensaţi pentru succesul lor cu Premiul Nobel pentru Fizică.

Ideea care a generat construcţia acestui tip de microscop se bazează pe *efectul tunel* care reprezintă trecerea (*tunnelling*) unei particule printr-o barieră de potenţial, a cărei valoare este mai mare decât energia particulei. Un astfel de microscop explorează deci numai materiale electroconductoare. Având o rezoluţie de 1nm, poate fi utilizat pentru studii la nivel atomic.

Principiul de funcționare. Atunci când se apropie de un material electroconductor un ac al cărui vârf este atât de ascuțit încât ajunge de dimensiuni atomice (1 atom), în el apare un microcurent electric ce rămâne constant dacă distanța dintre ac și suprafața materialului rămâne constantă. Invers, dacă se menține constantă intensitatea curentului în dispozitiv, rămâne constantă și distanța dintre ac și suprafața materialului.

Pornindu-se de la acest principiu, s-a realizat un aparat de o înaltă sensibilitate, la care, prin menținerea intensității curentului la un nivel constant, vârful acului explorator este constrâns să urmărească fidel toate iregularitățile suprafeței materialului cercetat, menținându-se la o distanță constantă față de aceasta. În componența instalației intră și un dispozitiv de înregistrare grafică și un calculator care prelucrează datele, astfel încât, prin analiza mișcărilor imper-ceptibile ale aerului, se poate reconstitui, atom cu atom, microrelieful suprafeței analizate, cu o rezoluție de 1nm.

Acest microscop folosește o *minisondă cu un vârf care se termină cu un singur atom*, care trasează conturul suprafeței investigate. Spre deosebire de microscopul electronic cu baleiaj convențional, care scanează suprafața unui preparat cu un fascicul extern de electroni, STM măsoară pendularea electronilor între sondă și suprafața preparatului, acest fenomen fiind cunoscut sub denumirea de *curent tunel*. Acest curent este corelat direct cu distanța dintre sondă și preparat. Modificările în distanța sondă-preparat, cu cel puțin 0,01nm (0,1Å), pot determina modificări exponențiale în curentul tunel. Ca urmare, STM are o bună rezoluție în domeniul unor dimensiunilor subatomice.

STM poate mări imaginea până la 100.000.000 de ori și este folosit pentru studierea structurii moleculare a ADN, a proteinelor și a altor structuri moleculare.

Performanţele unui astfel de microscop deschid perspective deosebite pentru studiul structurilor la nivel molecular şi atomic. De exemplu, Binning şi Rohner au reuşit să "deplaseze" unul câte unul atomii de pe o suprafaţă şi s-au amuzat scriind, cu numai 50 de atomi, sigla IBM!

Pe baza aceloraşi principii se preconizează, de asemenea, realizarea de veritabile maşini şi dispozitive ale căror mecanisme să fie însăşi atomii, precum şi crearea unor baze de stocare a informaţiilor în "dispozitive" de memorie de dimensiunea unei molecule (nanotehnologie)!

2.2.8. Microscopul interferometric de baleaj fără apertură (Scanning Interferometric Apertureless Microscope - SIAM)

Acest tip de microscop are o rezoluţie de 1nm, fiind numit şi **nanoscop**, permiţând investigaţii până la nivel atomic. SIAM a fost realizat de elveţianul **Zenhausen**, în laboratoarele IBM din New York.

SIAM prezintă asemănări cu microscopul cu efect tunel (STM), în ceea ce priveşte performanţele şi unele aspecte generale, dar între cele două tipuri de microscoape există şi deosebiri importante de construcţie şi funcţionalitate.

Astfel, cu STM se pot investiga numai materiale electroconductoare, în timp ce SIAM permite studiul unor probe fără proprietăţi electroconductoare, făcând posibilă cercetarea unor probe biologice fără riscul de a le degrada prin prelucrări fizico-chimice în vederea examinării (cum se întâmplă în cazul STM). Imaginile obţinute cu SIAM sunt astfel mai fidele.

Eşantioanele studiate sunt luminate cu raze laser cu lungime de undă de 0,6μm (lumină roşie tipică pentru un laser echipat cu tub de neon).

Fasciculul laser primar este împărţit în două fascicule secundare focalizate, unul de *analiză* şi altul de *referinţă* (**Fig. 31**).

Fasciculul de analiză este focalizat pe proba analizată care îl reflectă. Concomitent, acest fascicul întâlneşte o lamelă vibrantă microscopică, echipată cu un microvârf atât de fin încât extremitatea sa este constituită dintr-un singur atom. Această lamelă, constituie cheia principiului tehnic al acestui microscop.

Fasciculul de referinţă suferă o reflexie pe o plachetă de sticlă port-eşantion şi apoi se combină cu fasciculul de analiză, într-un dispozitv interferometric, după reflexia acestui fascicul de către eşantion şi lamela vibrantă. La combinarea celor două fascicule apare o reţea de franjuri de interferenţă, ce pot fi modificate prin vibraţia lamelei.

Lamela este în legătură cu un dispozitiv de excitare, care o determină să vibreze cu o frecvenţă de 250.000 de vibraţii pe secundă. Microvârful lamelei se apropie de proba de analizat până la o distanţă atât de mică, încât între atomul din extremitatea vârfului şi atomii eşantionului apar forţe de interacţiune Van der Waals (care în mod natural asigură coeziunea intermoleculară).

Apariţia acestor forţe modifică frecvenţa şi amplitudinea vibraţiilor lamelei. Intensitatea forţelor Van der Waals este proporţională cu distanţa dintre vârful vibrant şi probă. Fiecare moleculă de pe suprafaţa probei formează o "proeminenţă" care determină o reducere a distanţei dintre vârf şi eşantion, ceea ce modifică vibraţia lamelei. La baleiajul (deplasarea) vârfului deasupra eşantionului apar astfel de modificări ale vibraţiei lamelei, care reflectă topografia probei.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

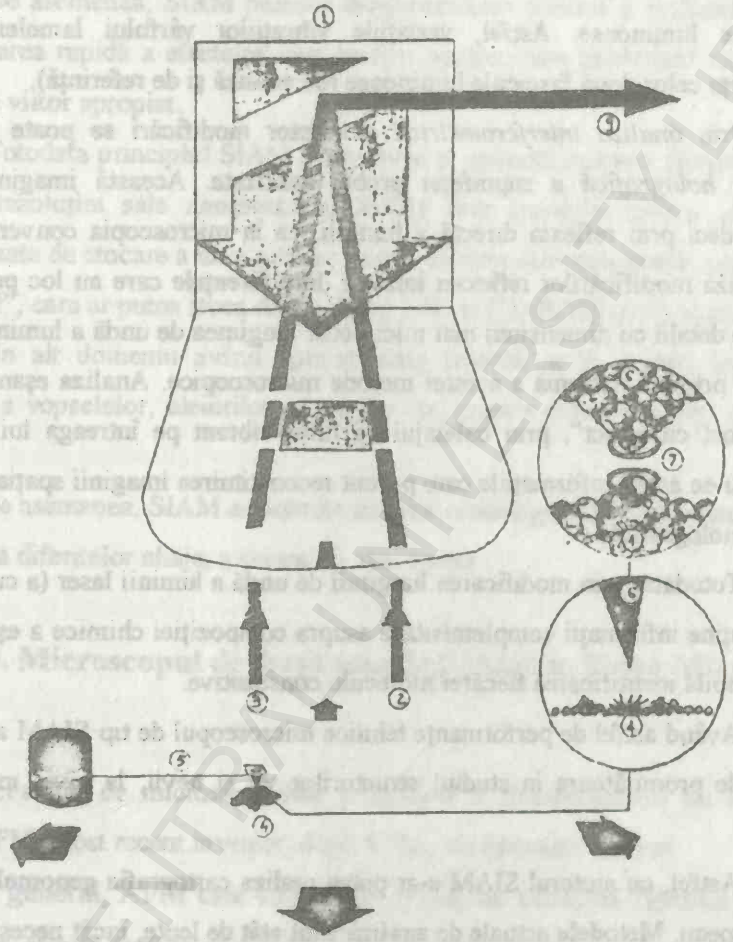


Fig. 31. Principiul nanoscopului (SIAM): 1- sursa laser; 2 - fasciculul de referință; 3 - fascicul de analiză; 4 - proba de analizat; 5 - lamela vibrantă; 6 - microvârf investigator; 7 - forțe de legătură intermoleculară Van der Waals; 8 - dispozitiv interferometric; 9 - fascicul suplimentar (după Penel, 1996)

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Pentru compunerea imaginii spaţiale a suprafeţei astfel investigate intervin fasciculele luminoase. Astfel, variaţiile vibraţiilor vârfului lamelei modifică interferenţa celor două fascicule luminoase (de analiză şi de referinţă).

Prin *analiza interferometrică* a acestor modificări se poate reconstitui *imaginea holografică* a suprafeţei probei analizate. Această imagine nu este obţinută deci prin reflexia directă a luminii, ca în microscopia convenţională, ci prin analiza modificărilor reflexiei luminii. Interferenţele care au loc permit să se detecteze detalii cu dimensiuni mai mici decât lungimea de undă a luminii, de unde rezultă o precizie extremă a acestei metode microscopice. Analiza eşantionului se face "punct cu punct", prin baleiajul vârfului vibrant pe întreaga lui suprafaţă, obţinându-se astfel informaţiile care permit reconstituirea imaginii spaţiale a probei (tehnica holografică).

Totodată, prin modificarea lungimii de undă a luminii laser (a culorii sale), se pot obţine informaţii complementare asupra compoziţiei chimice a eşantionului, fiind posibilă identificarea fiecărei molecule constitutive.

Având astfel de performanţe tehnice microscopul de tip SIAM are aplicaţii extrem de promiţătoare în studiul structurilor vii şi nevii, la nivel molecular şi atomic.

✓ Astfel, cu ajutorul SIAM s-ar putea realiza cartografia genomului uman şi al altor specii. Metodele actuale de analiză sunt atât de lente, încât necesită un efort imens. Astfel, pentru decodarea celor trei miliarde de nucleotide ale ADN uman, ar fi necesar mai mult de 10 ani. Cu ajutorul SIAM, însă, această perioadă s-ar reduce de 100 ori, încât în mai puţin de o lună s-ar putea realiza cartografierea genică a unui individ.

✓ De asemenea, SIAM permite diagnosticarea precisă a maladiilor genetice şi verificarea rapidă a efectelor unei terapii genice, care generează mari speranţe pentru un viitor apropiat.

✓ Totodata principiul SIAM poate avea şi aplicaţii tehnice deosebite. Astfel, datorită rezoluţiei sale nanometrice, SIAM face posibilă citirea unor discuri miniaturizate de stocare a unui număr imens de date informaţionale, pe un "super-CD-ROM", care ar putea stoca datele de pe 100 de CD-ROM-uri obişnuite.

✓ Un alt domeniu având aplicabilitate tehnică ar fi studiul repartiţiei pe suprafeţe a vopselelor, uleiurilor, cleiurilor etc, pentru perfecţionarea procedeelor practice.

✓ De asemenea, SIAM ar permite analize cristalografice fine asupra structurii cristaline a diferitelor aliaje, a ceramicii sau rocilor.

2.2.9. Microscopul de forţă atomică (Atomic Force Microscope - AFM)

Acest tip de microscop este o variantă a microscopului cu efect tunel (STM). AFM a fost recent inventat, după STM, din care este derivat.

În general, AFM este similar cu STM, cu excepţia faptului că sonda sa atomică atinge suprafaţa preparatului şi trasează conturul atomilor de pe această suprafaţă, într-o manieră similară cu modul în care o persoană nevăzătoare citeşte alfabetul Braille. Rezultă astfel o imagine topografică a preparatului, la nivel atomic.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Sonda atomică a unui AFM este montată pe un resort sub formă de pârghie (*cantilever*). Prin deflecțiuni reduse ale sale, această pârghie înregistrează modificările topografiei preparatului.

AFM a fost folosit cu succes pentru a vizualiza virusuri, structura matricei extracelulare, a eritrocitelor şi a aminoacizilor.

2.2.10. Microscopul confocal de baleiaj cu laser (Laser – Scanning Confocal Scanning Microscope – LSCSM)

Acest tip de microscop realizează focalizarea unui con de iluminare al unei raze laser, printr-o fantă fină (*pinhole aperture*) a unui dispozitiv, pe un punct specific al preparatului studiat. Când raza de lumină laser este scanată pe suprafața preparatului, lumina ce dă imaginea obiectului este focalizată pe un detector, printr-o a doua fantă fină, confocală.

Această a doua fantă vizualizează (ecranizează) lumina din toate punctele focale realizându-se o imagine bidimensională ondulată, dar precisă, numită *secțiune optică*. Microscopul permite combinarea unor multiple secțiuni optice, formându-se astfel imagini tridimensionale ale structurilor cromozomiale şi ale altor structuri celulare.

Microscopul confocal este utilizat în special pentru vizualizarea unor preparate subțiri, la care, în microscopia convențională, lumina poate fi difuzată.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

2.2.11. Microscopia Raman

Microscopia Raman reprezintă o tehnică specială de investigare a structurii moleculare a unor materiale de naturi diferite, îmbinând *tehnica microspectro-grafiei Raman* cu *microvizualizarea microscopică*, rezultând o *microvizualizare Raman*.

Spectrografia Raman are la bază *efectul Raman* reprezentat de generarea unor spectre de vibraţie-rotaţie, asemănătoare spectrelor în infraroşu (IR), determinate de absorbţia, de către unele structuri moleculare, a radiaţiilor electromagnetice cu lungimi de undă din domeniul infraroşu al spectrului (de 2-15μm sau 2.000-15.000nm).

Energia radiaţiilor absorbite determină vibraţii ale atomilor din moleculă şi rotaţii ale întregii molecule, care dau spectre de vibraţie – rotaţie, numite spectre IR, ce cuprind benzi de absorbţie la anumite lungimi de undă, corespunzătoare anumitor grupări din moleculă. Astfel, gruparea – OH dă o bandă de absorbţie la 3μm, iar gruparea C=O, o bandă de 5-6μm. Aceste benzi se pot studia prin analiză spectrală, cu ajutorul unor aparate numite spectroscoape (spectrografe) IR.

Deoarece apa din structurile studiate dă benzi de absorbţie în IR care interferează cu benzile unor grupări chimice, este necesar ca materialul să fie deshidratat, sau apa obişnuită să fie înlocuită cu apă grea (D_2O).

Prin spectroscopie IR s-au studiat lipidele şi proteinele din diferite structuri biologice (plasmalema, reticul endoplasmatic, mitocondrii), evidenţiindu-se tranziţiile de fază gel-cristal lichid ale fosfolipidelor şi

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

structurile α-helix, sau β-helix a polipeptidelor, în stări normale sau patologice (cancer).

Spectrele Raman sunt tot spectre de vibraţie-rotaţie, ca şi spectrele IR. În cazul spectrelor Raman, însă lumina care străbate corpurile, odată cu determinarea vibraţiei atomilor şi rotaţiei moleculelor corpului, suferă şi o difuzie (împrăştiere), determinată de aceste molecule. Dacă lumina difuzată are aceeaşi frecvenţă cu lumina incidentă, fenomenul se numeşte *difuzie Rayleigh*, iar dacă frecvenţa radiaţiei difuzate este mai mare sau mai mică decât cea a radiaţiei incidente, fenomenul se numeşte *difuzie Raman*.

Spectrele Raman prezintă avantajul că nu sunt perturbate de apa din structurile analizate. Ele se utilizează pentru studiul conformaţiei proteinelor biomembranare, al tranziţiilor de fază termotrope ale fosfolipidelor etc., iar prin combinarea microscopiei Raman cu tehnici speciale de vizualizare microscopică, rezultă o microvizualizare (microscopie) Raman ce prezintă imagini stereoscopice ale structurilor moleculare studiate.

Pentru mărirea performanţelor metodei se utilizează *markeri de rezonanţă Raman*, al căror spectru se modifică în funcţie de micromediul înconjurător. De asemenea, deosebit de utilă este *spectroscopia IR de diferenţă cu transformare Fourier* (FTIR), cu o mare sensibilitate de analiză.

2.2.12. Aplicaţii ale microscopiei electronice (ME)

Utilizarea ME permite obţinerea de informaţii privind:

- Ultrastructura diferitelor tipuri de celule şi a componentelor celulare în stare normală şi patologică.
- Structura şi configuraţia spaţială a macromoleculelor proteice.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- Aspectele biosintezei de proteine şi ale structurilor celulare implicate în acest proces; dinamica secreţiei celulare.
- Structura şi configuraţia spaţială a acizilor nucleici şi stabilirea greutăţii lor moleculare.
- Gradul de înrudire genetică între organisme.
- Structura moleculară a viruşilor şi mecanismele infecţiei virale.
- Procesele de transcripţie şi translaţie implicate în exprimarea codului genetic.
- Acţiunea unor substanţe (pesticide, substanţe toxice, agenţi farmacologici etc.) la nivelul structurilor celulare.
- Procese de filtrare şi transport de substaţe şi ioni prin membrane.
- Procese de internalizare a unor particule şi agenţi patogeni (fagocitoză, pinocitoză, transcitoză) şi procese de digestie celulară localizată şi autoliză, normale şi patologice.
- Procese ale mişcării celulare musculare şi nemusculare.
- Fazele ciclului celular, procesele diviziunii celulare şi dinamica cromozomilor.
- Procese ale diferenţierii celulare.
- Localizarea reacţiilor imunologice şi a activităţii enzimatice.
- Structura suprafeţelor ţesuturilor, celulelor şi biomoleculelor.
- Cartografierea genelor, stabilirea unor structuri la nivel molecular, ionic şi atomic.
- Procese ale îmbătrânirii celulare, ale patologiei celulare şi moleculare (transformarea malignă), moartea celulară (apoptoza şi necroza) etc.
- Prelucrarea şi stocarea de informaţii referitoare la structurile şi procesele investigate.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

2.3. Realizarea preparatelor pentru microscopia electronică

Studiul electrono-microscopic al materialului biologic necesită o pregătire corespunzătoare a preparatelor, care cuprinde mai multe procedee, în funcție de materialul cercetat şi scopul urmărit: studii pe secțiuni ultrafine, studii pe celule izolate şi pe organitele celulare obținute prin centrifugare diferențială, studii prin colorație pozitivă sau negativă a preparatelor depuse pe grilă (organite celulare, virusuri etc), studii pe material etalat pe grilă şi metalizat (umbrire) etc.

Pregătirea secțiunilor ultrafine pentru investigații electrono-microscopice cuprinde mai multe etape: *prelevarea materialului*, *fixarea*, *spălarea*, *deshidratarea*, *includerea într-un mediu polimeric*, *secționarea la ultramicrotom*, *etalarea pe grilă a secțiunilor*, *contrastarea şi colorarea secțiunilor*, *metalizarea*, *criofracturarea şi realizarea de replici*, *observarea*, *fotografierea* şi *obținerea imaginilor pozitive*.

Dacă se realizează analize histochimice sau histoenzimologice, după fixare se efectuează un tratament histochimic corespunzător.

2.3.1. Prelevarea

Țesuturile analizate sunt prelevate de la animale sacrificate cât mai repede posibil pentru a evita deformările. Se taie rapid cu o lamă de ras nouă fragmente de țesut, de $1cm^3$ care se introduc în fixatori adecvați, la 4^0C. Sângele trebuie recoltat pe anticoagulant (acid citric, dextroză), la rece.

BCU MS CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

2.3.2. Fixarea

Ca şi în microscopia fotonică, fixarea are drept scop menţinerea ultrastructurii şi a compoziţiei chimice a celulelor în stare nealterată, prin utilizarea unor soluţii fixatoare. Există numeroase metode de fixare, care prezintă anumite caracteristici şi care pot fi aplicate în funcţie de scopul urmărit. Astfel, pentru fixarea se folosesc **metode fizice şi metode chimice**.

A] Metode fizice constau în utilizarea temperaturilor foarte scăzute, cu sau fără infiltrarea prealabilă a ţesuturilor cu agenţi de crioprotecţie, pentru prevenirea formării cristalelor de gheaţă (care distrug structurile). În ultimul timp se utilizează *metoda deshidratării inerte* şi *metoda de substituţie prin îngheţare*.

B] Metodele chimice se bazează pe proprietăţile de fixare ale unor reactivi care blochează rapid enzimele şi metabolismul celular. Un fixator cuprinde două componente: **soluţia tampon şi agentul fixator**.

a. Soluţiile tampon asigură molaritatea amestecului şi pH-ul necesar (pentru studiile de ultracitochimie). Cele mai folosite sunt: *tamponul cacodilat* (compatibil cu toţi agenţii fixatori), *tamponul fosfat* (compatibil cu toţi fixatorii, dar nu şi cu ionii de uranil şi calciu), *tamponul veronal* (incompatibil cu fixatori aldehidici).

b. Agenţii fixatori

- *Anorganici*: oxizi (OsO_4), săruri (permanganat de potasiu şi bicromat de potasiu).
- *Organici*: formaldehidă, glutaraldehidă, acroleină, acizi (acidul tanic), catehine.

Fixarea poate fi **simplă, dublă** (doi fixatori succesivi), **triplă, combinată** (fixatori din grupe diferite). În practică se foloseşte o fixare dublă, ce cuprinde

BCU "ASIC CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

prefixarea, cu glutaraldehidă tamponată şi *postfixarea* cu tetraoxid de osmiu tamponat.

Există trei procedee de fixare:

- **Fixarea prin imersie** – fragmentele de ţesut se introduc în flacoane cu fixator ce se află într-un vas cu gheaţă (fixare postvitală).
- **Fixare prin sedimentare** – se realizează în tuburi de centrifugă, la preparatele care necesită o centrifugare. După centrifugare se păstrează sedimentul, peste care se pune fixator (câţiva ml), se agită, se lasă în repaus un timp necesar, se centrifughează, se îndepărtează supernatantul, iar sedimentul se prelucrează în continuare.
- **Fixare prin perfuzie** – soluţia fixatoare se injectează în circuitul sangvin al animalului de experienţă, înainte de sacrificarea acestuia.

Tehnica de lucru:

a. Fixator cu glutaraldehidă 5% în tampon cacodilat (Sabatini, 1962). Este util pentru tehnici ulterioare histochimice sau histoenzimologice (glutaraldehida permite păstrarea activităţii enzimelor), pentru fosfataze acide şi alcaline, glucozo-6-fosfatază, alte oxidaze. Se prepară următoarele soluţii stoc:

- ✓ soluţie tampon cacodilat de sodiu 0,2M (4,28g%), pH=7,4;
- ✓ soluţie tampon de spălare, cu pH=7,4: cacodilat de sodiu 0,1M (2,14g %), sucroză (7,3g%), HCl 0,1N;
- ✓ glutaraldehidă comercială, soluţie 25 %.

Amestecul fixator se prepară extemporaneu şi cuprinde:

- ✓ soluţie de glutaraldehidă 25 % .....20 ml
- ✓ soluţie tampon cacodilat 0,2 M.....60 ml
- ✓ apă distilată, până la un volum final de .....100 ml

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Durata fixării este variabilă (15min. – 2ore), la temperatură scăzută (0-4°C). Spălarea se face în patru băi succesive, de câte 30 min. fiecare. Postfixarea se face în soluție de permanganat de potasiu 0,6% sau acid osmic 1%, timp de două ore, la temperatura camerei.

b. Fixator cu acid osmic în tampon veronal acetat, pH = 7,4 (Palade, 1952).

Acest fixator poate fi utilizat direct, sau ca posttixator, după o fixare în amestec pe bază de aldehidă. Se prepară o soluție stoc formată din:

- ✓ soluție tampon veronal-acetat de sodiu (14,7g veronal de sodiu și 9,7g acetat de sodiu se dizolvă în 500ml apă);
- ✓ soluție de tetraoxid de osmiu 2%.

Amestecul fixator se prepară înaintea folosirii și cuprinde:

- ✓ soluție tampon veronal-acetat ..... 5 ml
- ✓ soluție de tetraoxid de osmiu 2 % ..... 12,5 ml
- ✓ soluție HCl 0,1 N..... 5 ml
- ✓ apă distilată ..... 2,5 ml

Se ajustează pH-ul la 7,2 și se folosește pentru fixare, la rece. Fixarea are o durată diferită: 30 min. pentru celule și 1-3 ore pentru țesuturi.

Este util pentru evidențierea ultrastructurii citomembranelor.

c. Fixator cu acid osmic 1% în tampon fosfat (Milloning, 1961)

Cuprinde următorul amestec:

- ✓ soluție de fosfat monosodic (NaH_2PO_4 H_2O) 2,26% ..... 83 ml
- ✓ soluție NaOH 2,52%..... 17 ml
- ✓ glucoză..... 0,54 g
- ✓ acid osmic..... 1 g

BCU MUREȘ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Condiţiile de fixare sunt identice cu cele de la fixatorul Palade. Sunt bine evidenţiate organitele celulare şi membrana plasmatică.

d. Fixator cu permanganat de potasiu în tampon veronal-acetat (Luft, 1956)

Cuprinde două soluţii stoc:

- ✓ soluţie apoasă de $KMnO_4$ 1,2%;
- ✓ soluţie tampon veronal-acetat (14,7g veronal sodic şi 9,7g acetat de Na în 500ml apă distilată). Înainte de utilizare, cele două soluţii se amestecă în părţi egale (v/v) şi se aduce pH-ul la 7,4-7,6.

Fixarea se face la temperatură scăzută, timp variabil (15min.-2ore), în funcţie de mărimea piesei şi scopul urmărit. Păstrarea ultrastructurii membranelor necesită o durată scurtă a fixării. Utilizarea $KMnO_4$ este controversată, datorită proprietăţilor sale puternic oxidante. Totuşi, acest fixator se utilizează cu succes pentru studiul reticulului endoplasmic, aparatului Golgi, membranelor nucleare.

e. Fixator în mediu de sucroză (Locke şi colab., 1971)

Se foloseşte pentru a preîntâmpina artefactele în cercetările histochimice şi histoenzimologice.

Fixatorul cuprinde:

- ✓ soluţie de glutaraldehidă 3%;
- ✓ soluţie tampon fosfat 0,08 M (pH =7,2);
- ✓ soluţie de sucroză 3%.

Fixarea durează diferit, în funcţie de mărimea piesei şi scopul urmărit (durate mici pentru enzimologie), la temperatura cerută de reacţia chimică. Piesa fixată se spală în soluţie de sucroză sau tampon fosfat, în 4 băi succesive, de câte 15min. fiecare.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

După desfăşurarea reacţiei histochimice urmărite, ţesutul se fixează în soluţie de acid osmic 1% în tampon cacodilat (pH=7,2), timp variabil (2-6 ore), la temperatură scăzută (0-4°C).

f. Fixator cu glutaraldehidă 10% în tampon fosfat (fixator 251) (după Cotrutz şi colab., 1994).

Cuprinde:

- ✓ glutaraldehidă distilată 10% .....2 părţi
- ✓ tampon fosfat 0,1 M .....5 părţi
- ✓ apă distilată .....1 parte

Fixatorul se păstrează în flacon închis cu dop rodat, deoarece glutaraldehida este toxică. Fragmentele de ţesut se menţin o oră în fixator, la frigider (4°C), iar după fixare se spală de trei ori cu tampon fosfat 0,15M la 4°C, timp de o oră la fiecare spălare.

După a treia spălare se face post-fixarea (în acelaşi flacon), cu un *fixator Milloning*, timp de o oră, la 4°C (tetraoxid de osmiu, 1g; tampon fosfat 0,15M, 100 ml).

Acest fixator trebuie păstrat în sticle brune cu dop rodat (fiind toxic), la frigider (4°C), putând fi utilizat 1-2 săptămâni de la data preparării.

2.3.3. Spălarea pieselor

Această operaţie se practică în scopul de a opri fixarea şi de a îndepărta excesul de fixator. Se recomandă ca probele să fie spălate cu aceeaşi soluţie tampon care s-a folosit şi la prepararea fixatorului, timp de 5-20min. sau chiar peste noapte.

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

2.3.4. Deshidratarea

Se face în scopul eliminării apei din țesuturile fixate, fără a produce modificări în structura acestora, utilizându-se solvenți de deshidratare, în concentrații crescânde.

Agentul de deshidratare se alege în funcție de materialul de includere, care trebuie să fie miscibil cu deshidratantul. Astfel, dacă pentru includere se folosește eponul, se alege ca deshidratant etanolul, iar dacă includerea se face în vestopal, deshidratarea se face cu acetonă.

Deshidratarea are loc în flacoane mici de sticlă (5-10ml), închise cu dop, la rece, pentru evitarea extracției lipidelor din structurile celulare. Piesele fixate și spălate se pun inițial într-o baie de alcool sau acetonă 50% (sau chiar 30%, pentru evitarea șocului osmotic), apoi în băi cu concentrații de 70% și 90% (acetonă) sau 95% alcool.

Pentru fiecare concentrație se fac două băi, de 15-30min. fiecare. La ultima concentrație, piesele se pot păstra chiar 1-4 zile fără alterări.

După baia în alcool 95% urmează o singură baie de etanol absolut, urmată de trei băi succesive de amestec etanol absolut – propilenoxid, în proporție de 1:3, 1:1 și 3:1 (v/v), timp de 30min. fiecare. După unii autori, cele trei băi în amestec alcool absolut – propilenoxid pot lipsi. În final, se fac 2 băi de propilenoxid pur, de câte 30min. fiecare, urmate de includere.

2.3.5. Includerea

În această etapă piesele de material biologic deshidratate se introduc într-un mediu lichid care, prin polimerizare, trece în stare solidă, probele putând fi astfel secționate.

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Materialele de includere trebuie să îndeplinească anumite condiţii: solubilitate în agenţii deshidratanţi, moleculă mică (pentru a pătrunde în ţesuturi), transparenţă, stabilitate la fluxul de electroni, stabilitate de volum, lipsa toxicităţii etc.

Cele mai utilizate medii de includere sunt *răşinile poliesterice* (vestopal), sau *răşinile epoxidice* (epon812, epon 562, eraldite), sau *medii de includere hidrofile* (durcopan, hidroxipropilmetacrilat), care au avantajul că împiedică deshidratarea şi conservă lichidele şi enzimele celulare. Deoarece răşinile sintetice sunt toxice, se recomandă ca păstrarea lor şi includerea să se facă sub nişă.

Includerea se face în capsule de gelatină sau de polietilenă (BEEM). Cele de gelatină trebuie să fie transparente şi bine uscate (se ţin câteva ore la termostat, la 60^{0}C). Capsulele de polietilenă se folosesc pentru includerea preparatelor biologice reprezentate de sedimente centrifugate (celule din culturi, bacterii, virusuri, organite celulare). Blocurile solidificate obţinute în capsulele de polietilenă sunt gata fasonate pentru secţionare.

Pentru material centrifugat, metodele mai vechi indicau o preincludere a materialului în gel de agar (0,8g agar-agar la 10 ml apă distilată; pe baie la 100^{0}C. Se răceşte la 45^{0}C şi se toarnă peste sedimentul din tubul de centrifugă agitându-se şi se lasă la răcit). Blocul obţinut se taie în fragmente de 1cm^3, care apoi se deshidratează şi se includ ca orice ţesut.

Capsulele de gelatină se aşează în poziţie verticală pe suporturi, iar pe marginea lor se introduc câteva picături de epon sau vertopal cu o pipetă, evitându-se formarea de bule. Cu un beţişor de lemn se introduce în fiecare capsulă câte un cubuleţ de ţesut, ce se aşează central. Se umple apoi capsula cu epon sau vestopal şi se lasă sub nişă până a doua zi. Apoi, suportul cu capsule se menţine la termostat, la 60^{0}C, 24-48 ore, până la polimerizarea materialului de includere.

Includerea în Epon 812 (după Cotrutz şi colab., 1994)

Mediul de includere cuprinde 3 componente:

- ✓ Amestec A (Epon 812 +DDSA).....5 ml
- ✓ Amestec B (Epon 812 + MNA) ..... 5 ml
- ✓ Accelerator DMP-30 .....0,15 ml

DDSA = anhidridă dodecil-succinică, MNA = anhidridă metilanadică, DMP = dimetilaminometil fenol.

Un amestec în raportul 5:5 (A:B) permite obţinerea de blocuri uşor de secţionat, cu un cuţit de sticlă (**Cotrutz şi colab., 1994**). Un amestec 3:7 dă blocuri uşor secţionabile cu un cuţit de diamant. Deshidratarea se poate face în etanol cu sau fără băi de oxid de propilen.

Tehnica de lucru:

- ✓ fixarea în glutaraldehidă tamponată
- ✓ spălare în tampon fosfat 0,15 M (vezi fixator 251)
- ✓ postfixare în OsO_4 tamponat (vezi fixatorul 251)
- ✓ spălare în tampon fosfat 0,15 M
- ✓ deshidratare în băi succesive de:

- alcool etilic 30% .....10 min.
- alcool 50%.....10 min.
- alcool 70% .....10 min.
- alcool 90% .....10 min.
- alcool 100% (2 băi) .....fiecare de 20 min.
- acetonă 100% (2 băi).....fiecare de 20 min.

Acetona poate lipsi, dar permite o impregnare mai bună.

- ✓ **impregnare în:**

- acetonă 100% în amestec cu epon de lucru 1:1 .....1 oră

BCU IASI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- epon de lucru .....1 oră

✓ includere: piesele cu proba biologică se introduc în capsule de gelatină cu epon de lucru, în nişă, la temperatura camerei, unde se menţin până când cad la fundul capsulelor

✓ polimerizarea eponului cu proba, la termostat, la 60°C, peste noapte.

2.3.6. Secţionarea

Preparatele fixate şi incluse sunt apoi secţionate cu ajutorul unor aparate de secţionare foarte precise, numite *ultramicrotoame*, care realizează secţiuni ultrafine, sub 1.000Å grosime, ce pot fi uşor traversate de fasciculul de electroni.

În vederea secţionării materialului la ultramicrotom se efectuează o serie de operaţii preliminare. Astfel, capsulele de gelatină se îndepărtează prin înmuiere în apă, iar cele din plastic prin tăiere cu lama. Piesa inclusă în răşină se fixează pe blocul port-obiectului, se aşează apoi pe un suport, la un stereomicroscop şi se fasonează.

a. Fasonarea blocurilor

Prin fasonare, preparatul inclus dobândeşte o formă de trunchi de piramidă, potrivită pentru secţionare. Folosirea unor capsule de polietilenă la includere, face ca blocul să apară gata fasonat, cu această formă.

În cazul folosirii unei capsule de gelatină, blocurile se fasonează manual, cu o lamă nouă de ras, sub un stereomicroscop, după fixarea blocului pe un port-obiect. Se realizează un trunchi de piramidă, al cărui vârf truncheat, ce conţine piesa, are latura de 0,1-0,2mm. Fasonarea se poate realiza şi la ultramicrotom sau cu aparate speciale, numite *piramitoame* (de tip LKB-1.1800 sau Reichert TM 60), metoda fiind mult mai rapidă şi mai precisă. O bună fasonare permite obţinerea unei panglici continui de secţiuni prin preparat.

b. Ultramicrotomul

În funcție de principiul înaintării preparatului spre cuțit, există două tipuri de ultramicrotoame: *cu avans mecanic* și *cu avans prin expansiune termică*. Ambele tipuri au două componente principale: ultramicrotomul propriu-zis și blocul electronic de control.

Ultramicrotomul cu avans mecanic este acționat manual și are un mecanism cu roți dințate, care determină avansul preparatului spre cuțit, în urma rotirii manuale ale unei roți cu manivelă.

Ultramicrotoamele cu expansiune termică pot fi cu mod de operare manual, semiautomat și automat (LKB, Reichert, OmU_3) și funcționează pe baza principiului dilatării termice.

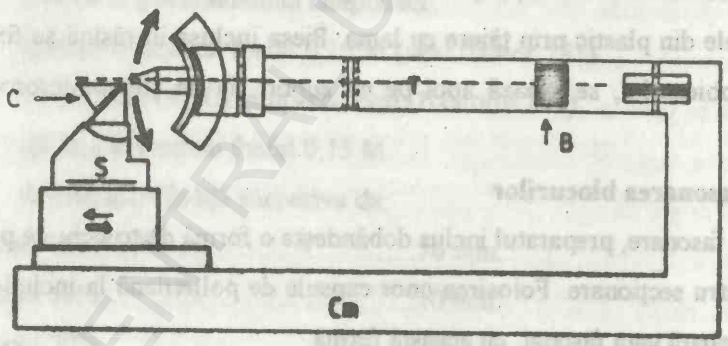


Fig. 32. Schema microtomului cu avans termic: Cm - cadru metalic; T - tija de dilatare care susține preparatul; B - bobina pentru încălzirea tijei; S - suport pentru cuțit; C - cuțit. (după Isac și colab., 1996).

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tija metalică ce serveşte ca suport pentru blocul ce trebuie secţionat este fixată la un capăt şi are înfăşurată pe ea o bobină (**Fig. 32**). La trecerea unui curent electric reglabil prin bobină, tija metalică se încălzeşte şi se dilată, transmiţând dilatarea spre extremitatea ei liberă, ce poartă preparatul, pe care-l deplasează astfel spre cuţit. Concomitent cu deplasarea pe orizontală, tija realizează şi o mişcare pe verticală, de sus în jos.

Există şi ultramicrotoame cu congelare cu reglaj electronic.

Pentru secţionare la ultramicrotom se utilizează două tipuri de cuţite: *de sticlă* (*cristal*) şi de *diamant*.

- *Cuţitele de sticlă* sunt realizate din sticlă de material superior, cu grosime de 5-8mm, de culoare albă (incoloră) în secţiune şi nu verzuie (cristal). Există şi sticlă specială, în benzi, pentru ultramicrotom, produsă de firma suedeză LKB, ce se livrează odată cu ultramicrotomul LKB.

Realizarea cuţitelor din sticlă se poate face manual sau cu ajutorul unui aparat special (aparatul Reichert – TAAB Knife Maker). Manual, din benzile de cristal se taie pătrate cu latura de 3cm, după care, pe o diagonală, se taie piesa în două părţi egale, cu un diamant. Cristalul se rupe pe tăietură cu un cleşte special, obţinându-se două piese triunghiulare. La stereomicroscop se alege muchia cea mai tăioasă şi dreaptă, care se va folosi pentru secţionare.

Cuţitele se păstrează aşezate vertical, în cutii speciale, sau în cutii Petri pe un pat de vată, pentru a le feri de praf. Înaintea folosirii, la cuţit se ataşează o mică baie cu apă, pentru colectarea secţiunilor pe suprafaţa apei.

- *Cuţitele de diamant* sunt mai durabile şi permit secţionarea materialelor de diferite duritaţi. Există două tipuri de cuţite de diamant: tipul standard şi cel special. Cuţitul standard se utilizează pentru secţionarea de material inclus în metacrilaţi sau vestopal, iar cel special, pentru răşini epoxidice.

BCU "ASACHI" IAŞI UNIVERSITY LIBRARY

c. Tehnica de secţionare şi colectarea secţiunilor

Înainte de începerea secţionării, se fac o serie de operaţii de pregătire şi reglaj.

Astfel, port-preparatul se fixează la extremitatea tijei de avans, iar cuţitul se ataşează la suportul său, urmărindu-se, la stereomicroscop, ca faţa ce priveşte spre aparat să fie alipită de ghidajul perpendicular al cuţitului, iar marginea tăioasă să fie paralelă cu suprafaţa preparatului.

În băiţa cuţitului se introduce o soluţie de acetonă sau alcool 10-15% (în cazul cuţitelor de sticlă) sau apă distilată (pentru cuţitele de diamant), urmărindu-se la stereomicroscop ca lichidul să atingă tăişul cuţitului.

Se urmăresc la stereomicroscop tăişul cuţitului şi piramida cu preparatul şi se aduce cuţitul foarte aproape de preparat, cu macroviza, iar apoi se trece aparatul pe control automat şi se fac o serie de mişcări în gol, până când preparatul atinge cuţitul.

Toate manevrele de reglare şi secţionare se urmăresc la stereomicroscop.

Grosimea secţiunilor se reglează electronic şi se poate controla vizual, prin culoarea lor în lumina reflectată pe suprafaţa lichidului din băiţa cuţitului, culoare care depinde de grosimea lor. Raportul dintre grosimea secţiunilor (în Å) şi culoarea luminii reflectate este următorul (**TABEL VII**)

TABEL VII Raportul dintre grosimea secţiunilor (Å) şi culoarea luminii reflectate

Culoare	Grosime (Å)
Cenuşie	330-600
Argintie	600-900
Aurie	900-1.500
Purpurie	1.500-1.900
Albastră	1.900-2.400
Verde	2.400-2.800
Galbenă	2.800-3.200

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În practica de rutină se consideră că secţiunile de culoare argintie au o grosime convenabilă (600-900Å). Grosimea secţiunilor este condiţionată de modul de fasonare al blocului, calitatea cuţitului şi unghiul său de înclinare (sub 30^0), nivelul apei la gura cuţitului, viteza de secţionare mică (pentru secţiuni ultrafine) etc.

Pentru a controla dacă blocul secţionat conţine elementele structurale dorite, se fac *secţiuni semifine* (1.500-3.200Å), care se culeg din bac cu o ansă de sârmă, se pun pe o lamă de sticlă, se colorează cu albastru de toluidină, azur II sau cu fucsină bazică – albastru de metilen. O coloraţie bună se face cu albastru de toluidină 0,1% în amestec cu carbonat de Na 2,5% 1:1, cu pH=11 (**Cotrutz şi colab., 1994**). Lamele cu secţiuni se încălzesc uşor pentru aderenţă, se adaugă 2-3 picături de colorant cu toluidină, se pun la termostat la 60^0C timp de 10-30 min., se spală cu apă de robinet şi apoi cu acetonă 100%, se trec rapid printr-o baie de xilol şi apoi se examinează la microscopul fotonic.

Secţiunile ultrafine (sub 900Å) sunt prea subţiri şI fragile pentru a fi manevrate în mod obişnuit şi de aceea, se aşează pe un portobiect special reprezentat de grile metalice acoperite cu pelicule – suport fine, care asigură o mai bună rezistenţă şi aşezare a secţiunilor pe grila suport.

Pentru studierea secţiunilor ultrafine se opreşte ultramicrotomul, iar panglica de secţiuni se fragmentează cu ajutorul unui fir de păr lipit de un beţişor (ansa de sârmă este prea grosieră). Cel mai indicat este un fir de păr de geană, lipit de un beţişor cu vârful său, rămânând liberă partea cu bulbul, la care secţiunile nu aderă. Secţiunile se grupează în şiruri paralele, pentru a putea fi depuse pe grilă în număr cât mai mare, iar pentru reconstituirea tridimensională a structurilor, se numerotează, păstrându-se ordinea lor.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

2.3.7. Montarea secţiunilor ultrafine pe grile

Există mai multe tipuri de suporturi pentru secţiuni, sub formă de grile şi discuri, realizate din: cupru, nichel, oţel inox, argint, aur, platină, molibden sau tungsten, pe cale electrolitică.

Grilele electrolitice au diametrul de 3,2mm şi sunt de mai multe tipuri: grilele standard, grilele de identificare şi grilele duble.

- *Grilele standard* se identifică după criteriul internaţional numit mesh care reprezintă numărul de ochiuri pe 1'' (1 inch = 2,54 cm). Mesh-ul se poate defini şi prin numărul de ochiuri pe 1μm (de ex: 5μm = 1 mesh = 1270 ochiuri; 10 μm = 1 mesh = 1.016 ochiuri). Cele mai potrivite grile sunt cele 200 mesh acoperite cu o peliculă organică sau cele de 300 mesh fără peliculă.
- *Grilele de identificare* au marginea solidă, iar în interiorul ochiurilor au indicaţii de referinţă pentru alegerea rapidă la microscop a unei anumite zone.
- *Grilele duble* sunt destinate pentru preparate suprapuse, având câte o grilă pe fiecare parte, fiecare cu un anumit tip de reţea.

Discurile metalice folosite în prezent, pe lângă grile, au un diametru de 3mm, cu un orificiu central rotund sau elipsoidal şi sunt realizate din cupru sau nichel.

Peliculele suport. Sunt de natură organică sau anorganică, de mare finețe, cu o grosime sub 200Å, transparente la fasciculul de electroni şi au rolul de a asigura o aşezare perfect plană a secţiunilor pe grilă şi o bună rezistenţă la fluxul de electroni.

Peliculele se prepară în laborator şi trebuie să aibă anumite caracteristici: să fie rezistente la manevrarea preparatului, să nu aibă structură proprie ce ar

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

deforma imaginea microscopică, să fie uniforme ca grosime şi cu suprafaţa netedă, să nu se încarce electric, să fie stabile la vid şi la bombardamentul cu electroni.

Există două tipuri de pelicule:

- *Peliculele anorganice* sunt utilizate pentru cercetări de înaltă rezoluţie, fiind constituite din aluminiu, beriliu, monoxid de siliciu sau cuarţ. Se obţin prin evaporarea în vid a acestor materiale. Pentru mărirea rezistenţei lor la fluxul de electroni, pe suprafaţa peliculelor se depune un strat fin de carbon, sub vid (10^{-5} - 10^{-6}torr), cu ajutorul unui aparat special.
- *Peliculele organice* se realizează prin diferite metode, din substanţe organice dizolvate în solvenţi adecvaţi. Există pelicule din: nitrat de celuloză în acetat de amil (soluţie de colodiu, zapon-lac sau parlodion), formvar, pioloform B, polistirol etc.

De exemplu, se pot realiza uşor pelicule din soluţie de formvar 0,25% în clorură de etilen sau soluţie de parlodion 0,5% în acetat de amil. Punându-se 2 picături dintr-o astfel de soluţie, pe suprafaţa apei dintr-un cristalizor, se obţine o peliculă fină de substanţă. Cu o pensă fină se plasează grilele pe peliculă şi se aşează deasupra lor o lamă de microscop care se scufundă prin rotire uşoară, fixând pe suprafaţa sa, grilele pe care s-a depus pelicula de formvar sau parlodion. Apoi, lamele cu grile sunt aşezate în cutii Petri, se usucă şi se păstrează acoperite, până la utilizare.

Materialele biologice pregătite pentru microscopul electronic se pot prezenta sub diferite forme: *suspensii* (celule libere – celulele sangvine, celule din culturi, bacterii, fracţiuni celulare, virusuri, molecule), *secţiuni ultrafine* sau *replici* ("copii") ale preparatelor biologice.

Suspensiile se pot depune pe grile prin patru metode:

- ✓ depunerea suspensiei cu ajutorul unei micropipete;

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- ✓ depunerea preparatului prin absorbţie;
- ✓ depunerea prin întindere;
- ✓ depunerea prin pulverizare.

Secţiunile ultrafine pot fi depuse pe grile prin culegerea lor directă de pe suprafaţa apei din bac, prin contactul lor cu pelicula carbonată de pe grilă. De exemplu, cu o pensă fină, grilele cu peliculă se apropie de suprafaţa apei cu secţiuni, iar acestea se prind pe pelicula de formvar (sau alt material). Se îndepărtează apa în exces cu ajutorul hârtiei de filtrare, ceea ce face ca secţiunile să adere puternic la pelicula de pe grile. Grilele cu secţiuni se usucă, se colorează şi apoi se montează, pe vârful unei tije speciale, cu ajutorul căreia se introduc în tubul microscopului electronic, în camera destinată examinării lor.

2.3.8. Colorarea preparatelor biologice

Preparatele biologice au o putere slabă de împrăştiere a electronilor şi, în consecinţă, nu prezintă contrastul necesar observării la microscopul electronic. Pentru creşterea contrastului secţiunilor realizate, se utilizează mai multe metode de colorare: **colorarea pozitivă, colorarea negativă, umbrirea.**

A] Colorarea pozitivă

Această metodă se bazează pe interacţiunea dintre structurile biologice şi un colorant constituit din săruri ale unor metale grele, având loc o cuplare chimică a colorantului cu moleculele preparatului. Colorantul penetrează în structura preparatului şi determină împrăştierea electronilor, datorită greutăţii sale atomice mari, ceea ce are ca efect mărirea contrastului structurilor biologice.

Trebuie precizat că, prin analogie cu metodele de colorare histochimice din microscopia fotonică, procedeul de intensificare a contrastului structurilor celulare, cu ioni metalici grei, a fost numit tot colorare, în microscopia electronică.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Metode de colorare pozitivă:

a. Colorarea dublă

În practica obişnuită, se realizează o *colorare pozitivă dublă*, cu acetat de uranil şi citrat de plumb.

Se realizează mai întâi o colorare în soluţie de acetat de uranil şi apoi în soluţie de citrat de plumb alcalin, obţinându-se imagini electronomicroscopice clare pentru majoritatea infrastructurilor celulare.

- *Colorarea cu acetat de uranil* **(Watson, 1958)**.

Se prepară o soluţie de acetat de uranil 13% (sau 7,7%) în alcool etilic 50%, la 15°C; se păstrează în sticle brune.

Într-o serie de godeuri de pe o placă de plexiglas se pune soluţie de acetat de uranil, cu o pipetă automată, sau cu o pară de cauciuc. Se iau grilele cu secţiuni cu ajutorul unei pense fine şi se aşează cu secţiunile în jos, pe suprafaţa soluţiei din godeuri, lăsând secţiunile în contact cu soluţia, timp de 10 min. (sau 15-30 min. în soluţia de 7,7%, la întuneric). Apoi se iau grilele de pe suprafaţa soluţiei şi se spală în trei băi succesive de alcool etilic 50%, iar în final se usucă alcoolul de pe grilă cu sugativă.

Această coloraţie evidenţiază bine proteinele, cromatina nucleară şi acizii nucleici.

- *Colorarea cu citrat de plumb* **(Reynolds, 1963)** se execută după colorarea cu acetat de uranil, pe aceleaşi grile.

Într-un balon cotat se prepară o soluţie amestec, din:

- nitrat de plumb.....1,33 g
- citrat de sodiu .....1,76 g
- apă distilată ..... 30 ml

BCU "LUCIAN BLAGA" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Amestecul se agită puternic timp de 30 de min. Se adaugă apoi 8ml soluţie de NaOH 1N şi se completează până la 50ml, cu apă distilată.

Soluţia de NaOH se prepară înaintea folosirii, din substanţă pură.

Atenţie: soluţiile pe bază de plumb sunt toxice şi trebuie manevrate cu grijă.

Pe o placă de parafină curată se pun mai multe picături din soluţia Reynolds, în număr egal cu numărul grilelor. Peste picături se aşează grilele cu secţiunile în jos şi se ţin 3 min. (5-30 min. la colorarea anterioară cu acetat de uranil 7,7%). Se spală apoi cu apă distilată, iar excesul de apă se absoarbe cu hârtie de filtru. Secţiunile pot fi examinate ulterior, la microscopul electronic.

Se pot utiliza şi alţi coloranţi, cum ar fi: acid fosfotungstic 40%, acid silicotungstic 40%, clorură de platină 10%, clorură de lantan 7,5%, azotat de thoriu 30%, tetraoxid de osmiu 1%, azotat de argint 10%, clorură feroasă 0,2% şi acetat de uranil 1%.

b. Colorarea cu permanganat de potasiu (Lawn, 1960)

Este o altă colorație pozitivă, utilizată în special pentru evidenţierea structurilor membranare.

Se prepară o soluţie proaspătă de permanganat de potasiu sau de bariu 1%. Grilele se suspendă pe suprafaţa picăturilor de colorant, timp de 3-10 min. Secţiunile se spală apoi cu o soluţie de acid citric, în două băi de câte 5 min. fiecare, după care se usucă pe hârtie de filtru. În această metodă se preferă să se lucreze cu secţiuni montate pe grile neacoperite, deoarece permanganatul solubilizează pelicula de formvar.

B] Colorarea negativă.

Este o metodă mult utilizată în microscopia electronică, fiind simplă şi rapidă. Se bazează pe un principiu asemănător cu cel din microscopia fotonică pe fond întunecat, presupunând examinarea preparatului plasat într-o soluţie care

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

conţine un pigment întunecat, care-l acoperă şi pătrunde în spaţiile lui libere, preparatul apărând astfel electronotransparent pe un fond electronodens.

In cazul acestei metode, colorantul serveşte ca fond întunecat pentru preparat, fără a-l colora în realitate, deci fără a exista o reacţie chimică între colorant şi structurile biologice, ca în cazul colorării pozitive.

Preparatul biologic, transparent la fasciculul de electroni, obţinut prin fracţionare celulară, este depus pe un pat (suport) de colorant electrono opac, fiind orientat cu secţiunea spre ecranul microscopului. Apoi el este examinat la microscopul electronic şi fotografiat.

Astfel de substanţe folosite drept coloranţi opaci sunt: acidul fosfotungstic, tungstatul de sodiu şi cel de litiu, molibdatul de amoniu, silicatul de sodiu, nitratul de uranil, acetatul de uranil, acetatul de lantan, care se pot fixa selectiv pe anumite structuri.

Prin intermediul lor, se pot studia structurile tridimensionale ale organitelor celulare purificate (ultracentrifugate), ale virusurilor, biomoleculelor etc. la o rezoluţie de 15 - 20Å.

Procedeele folosite în cadrul acestei metode sunt: *colorarea directă, colorarea pe grilă, colorarea prin imersie, colorarea prin flotare, aplicarea prin pulverizare.*

- Colorarea cu acid fosfotungstic

Se prepară o soluţie de acid fosfotungstic 1% în alcool etilic 50%. Se aşează grilele cu secţiuni pe picături de colorant şi se menţin 15-30 de min., la temperatura camerei, având loc coloraţia. Grilele se spală bine cu apă distilată, pentru evitarea formării de precipitate pe secţiuni.

Această metodă evidenţiază bine structurile proteice şi mai slab membranele celulare.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

C] Umbrirea

Anumite materiale biologice (bacteriile, virusurile, ribozomii, cilii, flagelii, membranele, acizii nucleici, enzimele) prezintă un slab contrast în fluxul de electroni. Pentru a mări contrastul lor şi pentru a permite vizualizarea, se aplică o serie de procedee de umbrire prin care pe materialul biologic se evaporă sub vid o suspensie metalică (crom, platină, uraniu) sub un anumit unghi **(Müller, 1942)**. Acestea sunt cunoscute şi sub denumireade "metalizare". În funcţie de suprafaţa obiectului, pe aceasta se va depune un strat de metal de grosimi diferite. Ca urmare, dispersia electronilor în anumite zone ale preparatului va fi diferită. Pe microfotografii, obiectele umbrite prezintă un contur clar. Pentru ca "umbra" să apară întunecată, microfotografiile se copiază în negativ după imagini pozitive.

Metoda permite aprecierea mărimii particulelor studiate. Astfel, măsurând lungimea umbrei şi cunoscând unghiul de umbrire, se poate determina înălţimea obiectului, după regula unghiului drept (înălţimea este o catetă).

La aplicarea acestei metode, trebuie să se ţină seama de mai multe elemente: *aparatul utilizat la metalizare*, *alegerea materialelor de umbrire* (în funcţie de natura preparatului), *suportul de evaporare*, *distanţa şi unghiul de evaporare*, *grosimea stratului evaporat*.

a. Aparate de metalizare

Există diferite tipuri de aparate de metalizare, în funcţie de caracteristicile lor şi scopul urmărit. Cele perfecţionate realizează un vid înalt, necesar evaporării de mare fineţe, şi posedă surse diverse de evaporare, permiţând evaporări simultane de mai multe substanţe. Se poate aprecia grosimea stratului de metal depus.

b. Materiale pentru metalizare

Cele mai potrivite s-au dovedit a fi materialele cu densitate mare, care se depun în cantitate mică şi asigură un contrast bun: aurul, cromul, aliajul aur-paladiu, uraniul, tungstenul, oxizii de tungsten, platina etc.

BCU IAŞI - UNIVERSITY LIBRARY

c. Suportul pentru evaporare

Evaporarea se poate realiza pe diferite suporturi cu care sunt echipate aparatele de metalizare: containere mici din tungsten, molibden sau grafit, coşuleţe din tungsten, creuzete mici de ceramică prevăzute cu filament de tungsten. Suportul nu trebuie să reacţioneze cu materialul evaporat.

Evaporarea se obţine prin metode diferite, cea mai folosită fiind evaporarea cu ajutorul unui arc electric.

Metalizarea este indispensabilă pentru cercetări privind: configuraţia spaţială a moleculelor de acizi nucleici şi proteine, obţinerea de replici ("copii") de pe anumite structuri biologice (de ex. membrane), în metodele de congelare şi uscare în vid (freeze drying), de îngheţare, fracturare şi sublimare în vid (freeze etching) şi pentru acoperirea preparatelor biologice care sunt studiate cu microscoape electronice de tip TEM, SEM sau STEM.

Contrastul este dat de stratul metalic fin, depus pe preparat. Zona transparentă (umbra) lăsată pe preparat face ca acesta să apară în relief pe suport. Imaginea obţinută pe plăci este pozitivă. Pentru copiere pe hârtie fotografică, ea trebuie inversată, adică recopiată pe altă placă fotografică şi apoi pe hârtie.

Prin această tehnică se pot "îngroşa" (chiar de 10 ori) anumite structuri macromoleculare filamentoase, cum sunt cele de ARN (20Å), ele putând fi astfel vizualizate.

BCU IASI CENTRUL UNIVERSITAR LIBRARY

2.4. Înghețarea, fracturarea și sublimarea în vid (criofracturarea)

O problemă importantă în pregătirea preparatelor biologice, în vederea examinării lor microscopice, este reprezentată de prevenirea artefactelor.

Metoda de înghețare, fracturare și sublimare în vid, denumită înghețare-fracturare (criofracturare, *freeze fracturing*), înghețare-secționare și sublimare în vid (*freeze etching*), păstrează nealterată structura preparatelor. Această metodă îmbină *un aparat de metalizare* cu *un crioultramicrotom*, aflat sub clopotul de vid al aparatului.

Arhitectura ultrastructurală a celulei, redată de replicile obținute după structurile înghețate brusc, este fidelă stării naturale a celulei. Astfel, se obțin fracturi ale membranelor celulare prin "despicarea" acestora între cele două monostraturi fosfolipidice componente, proteinele rămânând atașate la unul sau altul din monostraturi. Se realizează apoi replici care se examinează la microscop.

Replicile constau în acoperirea preparatului cu o peliculă fină de substanță anorganică sau organică și detașarea acesteia, obținându-se o copie negativă (amprentă), ce se studiază la microscop. Aceste amprente reproduc fidel toate detaliile ultrastructurale ale preparatului, sunt ușor traversate de fluxul de electroni și oferă informații exacte.

Avantajul metodei constă în faptul că se evită fixarea și includerea, precum și artefactele.

Metoda de fracturare și sublimare în vid cuprinde mai multe etape: *înghețarea, secționarea, sublimarea, metalizarea, eliberarea replicii*.

BCU "CAROL I" BUCUREȘTI LIBRARY

În tehnicile actuale de înghețare a țesuturilor, proba este așezată pe suprafața unei piese metalice din cupru pur, răcită la temperatura heliului lichid, de 3K (-270°C). În acest mod înghețarea are loc instantaneu (în 2ms), procesele celulare încetând astfel imediat. Țesuturile devin vitroase (cu structură amorfă), evitându-se formarea de cristale de gheață care ar distruge structurile celulare, ce se sunt menținute astfel nealterate.

Țesuturile înghețate sunt secționate (fracturate) cu ajutorul unui crioultramicrotom, cu un cuțit special, răcit la -190°C cu azot lichid (Fig.33a). Gheața formată pe suprafața fracturată este înlăturată prin sublimare în vid (Fig.33b).

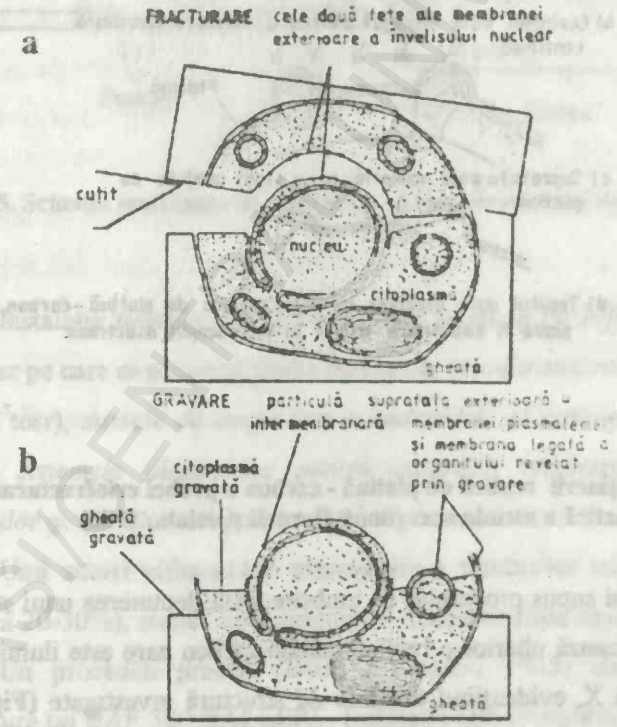


Fig. 33. Schema realizării criofracturii (a) și criodecapajului (b) (după Alberts și colab., 1989)

Ţesutul fracturat prezintă pe suprafaţă anumite neregularităţi corespunzătoare particulelor şi organitelor celulare (Fig.34).

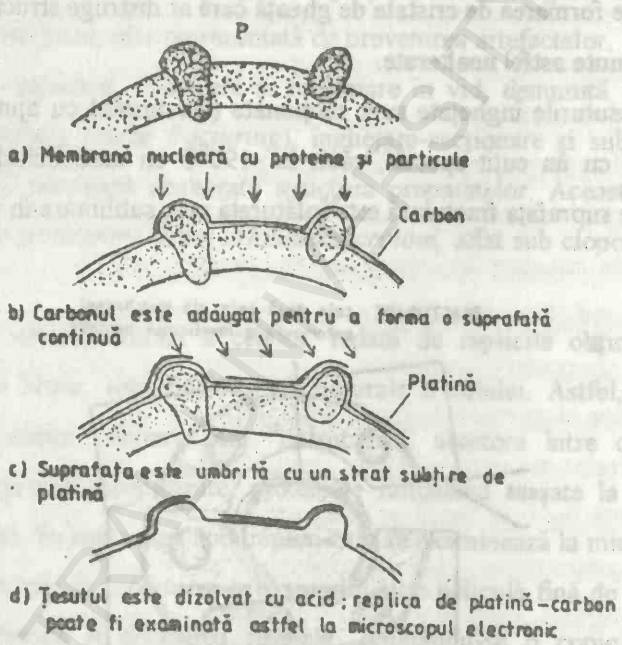


Fig. 34. Schema obţinerii replicii de platină - carbon a probei criofracturate: P - faţa plasmatică a membranei (după Darnell şi colab., 1986)

El este apoi supus procesului de umbrire, prin depunerea unui strat subţire de platină. Se realizează ulterior o replică platină-carbon care este iluminată cu un fascicul de radiaţii X, evidenţiind detaliile de structură investigate (Fig.35). Prin această metodă a fost precizată arhitectura lipido-proteică a biomembranelor (de

ex. partea internă a monostratului fosfolipo-proteic, care nu este accesibil prin alte metode).

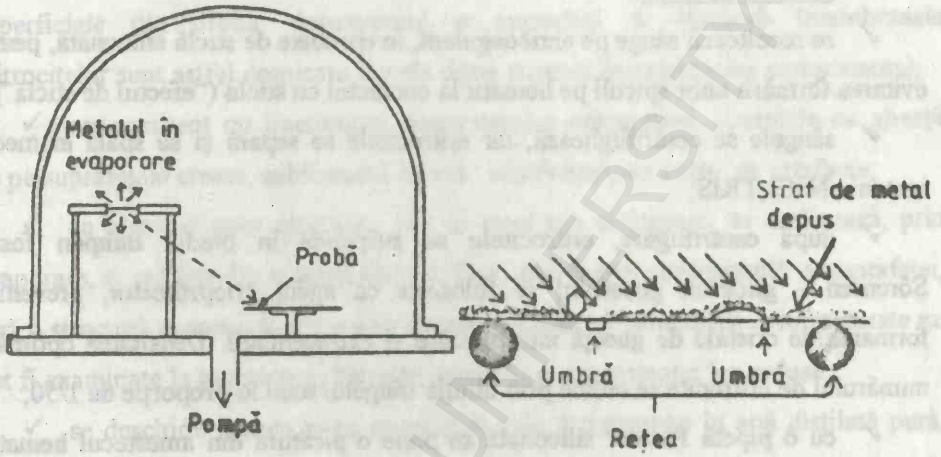


Fig. 35. Schema instalației de sublimare și metalizare a criofracturii (după Karp, 1984)

Instalația tehnică utilizată cuprinde: *sistemul de refrigerare cu piesa din cupru pur* pe care se plasează proba biologică, *crioultramicrotomul*, *sistemul de vid* (10^{-6}-10^{-7}torr), *sursele de evaporare a cadmiului și carbonului și de umbrire a replicii*, *sistemele electronice pentru controlul temperaturii și al grosimii depunerilor* și un *microscop de control al procesului*.

Unii autori utilizează o impregnare a țesuturilor cu agenți crioprotectori (glicerină 20-30%), atunci când conținutul de apă tisulară depășește 70%.

Un procedeu practic (Rusu și colab., 1988) utilizează instalația de criofractură tip BAF 300 BALLERS. Instalația este complexă, fiind alcătuită dintr-o *incintă* sub formă de clopot în care se realizează procesul de criofractură și sublimarea la presiune scăzută, o *platină refrigeratoare*, un *microtom*, un *tun*

electronic pentru obţinerea replicilor, un *echipament optic* pentru observarea incintei, *pompe de vid înalt*, *dispozitive de comandă*.

Utilizarea criofracturii pe celule sangvine implică mai multe etape.

Tehnică de lucru:

✓ se recoltează sânge pe anticoagulant, în eprubete de sticlă siliconată, pentru evitarea formării unor spiculi pe hematii la contactul cu sticla ("efectul de sticlă");

✓ sângele se centrifughează, iar eritrocitele se separă şi se spală în mediu izotonic NaCl-TRIS;

✓ după centrifugare, eritrocitele se suspendă în mediu tampon fosfat Sörensen – glicerol; glicerolul se foloseşte ca agent crioprotector, prevenind formarea de cristale de gheaţă intracelulare şi extracelulare. Densitatea optimă a numărului de eritrocite se obţine prin diluţia sângelui total în proporţie de 1/50;

✓ cu o pipetă Pasteur siliconată se pune o picătură din amestecul hematii-mediu crioprotector pe un portobiect din platină;

✓ în prima etapă de vitrificare, portobiectul se scufundă într-un mic rezervor cu freon 22, care se află la suprafaţa unui vas Dewar care conţine azot lichid;

✓ în a doua etapă de vitrificare, portobiectul este introdus rapid în azotul lichid din vas;

✓ se transferă probele extrem de rapid (în mai puţin de o secundă) pe platina refrigeratoare cu locaşuri pentru patru probe;

✓ concomitent se pregăteşte şi sistemul de criofractură: după ce pompa de difuzie funcţionează 30 de min., se prepară electrozii de platină-carbon care se fixează şi se centrează, iar platina se răceşte la -100°C;

✓ probele congelate în azot lichid (la -196°C) se transferă foarte rapid (în mai puţin de o secundă) pe platina răcită;

✓ se închide ermetic incinta cu proba congelată şi se pun în funcţie pompele de vid până la obţinerea unui vid minim de 2 x 10^{-6}torr, concomitent cu răcirea criomicrotomului la -100^{0}C;

✓ probele congelate sunt fracturate cu microtomul, ce îndepărtează straturile superficiale din probă, descoperind o suprafaţă de fractură (membranele eritrocitelor sunt astfel despicate în cele două straturi lipidoproteice componente);

✓ concomitent cu fracturarea membranelor eritrocitare, cristalele de gheaţă de pe suprafeţele create, sublimează în vid, eliminându-se sursa de artefacte;

✓ cu ajutorul unor electrozi, sau al unui tun electronic, se realizează, prin evaporare, o replică din platină-carbon fină, dar foarte contrastantă a suprafeţei, fără o structură proprie. Replica este necesară deoarece structurile criofracturate nu pot fi examinate la microscop, datorită grosimii şi a rezistenţei lor reduse;

✓ se deschide incinta şi se imersează cele 4 portprobe în apă distilată pură, având loc separarea instantanee a replicilor. Replicile se transferă apoi, cu o ansă fină din platină, într-un mediu de digestie pentru fragmentele organice reziduale (de exemplu, apă de Javel), unde se menţin două ore;

✓ după digestie, replicile se spală în apă bidistilată, iar apoi se transferă pe grile electrostatice, în vederea examinării la microscopul electronic.

BCU IASI CENTRALA UNIVERSITARA LIBRARY

BIBLIOGRAFIE

1. ALBERTS B., BRAY D., LEWIS J., RAFF M., ROBERTS K., WATSON J.D. – *Molecular Biology of the Cell*, 2nd edition, Garland Publishing Inc., New York, London, 1989, 1219p
2. ALBERTS B., BRAY D., LEWIS J., RAFF M., ROBERTS K., WATSON J.D. – *Molecular Biology of the Cell*, 3rd edition Garland Publishing Inc., New York, London, 1994, 1294p
3. AMBRUŞ I., BALŞ M., CAJAL N., CĂPÂLNĂ S. şi colab. – *Metode de laborator de uz curent*. Ed. Medicală, Bucureşti, 1975
4. AMBRUŞ I., IONESCU M.GH., THEODORESCU A. – *Fizică medicală şi aparatură de laborator*. Ed.Didactică şi Pedagogică, Bucureşti, 1971, 521p
5. BALŞ M., APREOTESEI C., BANCIU T., BÂLBÂIE V. şi colab. – *Metode de laborator de uz curent*. Ed. Medicală, Bucureşti, vol.II, 1977
6. BENGA GH. – *Îndrumător pentru lucrările practice de Biologie celulară*. Litografia IMF, Cluj-Napoca, 1982, 72p
7. CAMPBELL I., DUFFUS J.H. (Eds.) – *Yeast – A practical approach* în *Practical Approach Series*, Rickwood D. and Hames B.D. editors, IRL Press, Oxford, Washington D.C., 1991, 289p
8. CELIS J.E. (ed.) – *Cell Biology, A Laboratory Handbook*, 1st ed., vol. I, II, III, Academic Press, San Diego, London, 1994
9. CELIS J.E. (ed.) – *Cell Biology, A Laboratory Handbook*, vol.I, II, III, IV, 2nd edition. Academic Press, San Diego, London, 1998
10. COTRUTZ C., COTRUTZ CARMEN, IONESCU C.R., PETREUŞ T. – *The Cellular and Molecular Biology – Laboratory Handbook*. Ed. UMF, Iaşi, 1996, 155p
11. COTRUTZ C., COTRUTZ CARMEN, KOCSIS MARIA, IONESCU C.R. – *Manual de lucrări practice de Biologie celulară*. Ed. Tehnica, Chişinău, 1994, 248p
12. DARNELL J., LODISH H., BALTIMORE D. – *Molecular Cell Biology*, Scientific American Books Inc., 1986, 1187p

BCU IAŞI – UNIVERSITY LIBRARY

13. HEFCO V.P. – *Lucrări practice de fiziologie a animalelor şi a omului: sângele, inima, circulaţia sangvină*. Universitatea "Al.I.Cuza", Iaşi, 1975, 100p
14. HOFFMANN K. – *Abriss der Laboratoriumsstierkunde*, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1961, 308p
15. ISAC M. – *Biofizică – de la Big Bang la ecosisteme*. Ed.Tehnică, Bucureşti, 1996, 276p
16. ISAC M.I. – *Biofizica – Manual pentru lucrări practice*. Universitatea "Al.I.Cuza", Facultatea de Biologie-Geografie-Geologie, Iaşi, vol.I, 1978, 139p
17. KARP G. – *Cell Biology*, 2nd edition, McGraw-Hill Book Company, New York, London, Paris, Tokyo, 1984, 896p
18. KONDI V. – *Laboratorul clinic – Hematologie*. Ed. Medicală, Bucureşti, 1981, 463p
19. LIM D. – *Microbiology*, 2nd edition, WCB McGraw-Hill, Boston, New York, San Francisco, 1998, 720p
20. MANTA I., BENGA GH., CUCUIANU M., HODÂRNĂU A. – *Metode biochimice în laboratorul clinic*. Ed. Dacia, Cluj-Napoca, 1976, 450p
21. MAUNSBACH A.B. – *Biomedical Electron Microscopy*. Aarhus, Stockholm, 1998, 346p
22. MEŞTER R., SCRIPCARIU D. – *Manual de lucrări practice de Biologie celulară*. Universitatea Bucureşti, 1976, 269p
23. MISĂILĂ C., COMĂNESCU GIANINA – *Elemente de Hematologie generală*. Ed. Corson, Iaşi, 1999, 213p
24. MIXICH F., CRUCE M., ARDELEAN A., TOSICI A. –*Principii experimentale în biologia moleculară*. Ed. Sintech, Craiova, 1997, 200p
25. OLDFIELD R.J. – *Light Microscopy, An Illustrated Guide*. MacQuarrie University, Sydney, 1993, 160p
26. PENEL H.P. – Nanoscopie: Le microscope capable de voire les genes, Science et Vie, no. 942, 1996, 86-89
27. POAIE P.G., PETRE ZOE – *Introducere în microscopia electronică, cu aplicaţii la biologia celulară şi moleculară*. Ed. Academiei Române, Bucureşti, 1979
28. PRISECARU MARIA – *Biologie celulară – Caiet de lucrări practice*. Tipografia S.C.BAC-PRINT S.R.L., Bacău, 1998, 185p
29. RĂILEANU C., RĂILEANU IOANA – *Atlas de hematologie clinică*. Ed. Academiei Române, Bucureşti, 1974
30. SADAVA D.E. – *Cell Biology*, Jones and Barlett Publishers, Boston, London, 1993, 698p

31. SLUDER G., WOLF D.E. (Eds.) – *Video Microscopy*, Worcester Foundation for Experimental Biology, Shrewsbury, Massachusetts, 1998, 334p
32. STEVENS J.K., MILLS L.R., TROGADIS J.E. – *Three Dimensional Confocal Microscopy, Volume Investigation of Biological Specimens*. Toronto, 1994, 500p
33. STROSCIO J.A., KAISER W.J. – *Scanning Tunneling Microscopy*. Gaithersburg, Pasadena, 1994, 459p
34. ŞERBĂNESCU-JITARIU GABRIELA, ANDREI M., RĂDULESCU-MITROIU NATALIA, PETRIA ELENA – *Practicum de Biologie vegetală*. Ed. Ceres, Bucureşti, 1983, 217p
35. TUDORANU GH., BRĂTIANU A., NICULESCU M. – *Metode de explorare de laborator în bolile sistemului hematopoietic şi ale sângelui*. Ed. Medicală, Bucureşti, 1959
36. TURRELL G., CORSET J. – *Raman Microscopy, Developments and Applications*. Lille, Villeneuve d'Ascq, 1996, 528p
37. ŢIŢEICA MARIA, HALUNGA-MARINESCU SPERANŢA – *Practica laboratorului clinic*. Ed. Academiei Române, Bucureşti, 1984

6492/99

Tiparul executat la
Centrul de multiplicare al
Editurii Universităţii «Al. I. Cuza»

STR. PĂCURARI NR. 9, IAŞI - 6600

Format: 70×100/16
Coli tipo: 13,25
Apărut: 1999
Comanda: 148

B.C.U. „M. EMINESCU" IAŞI

40.000 lei

BCU IAŞI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IAȘI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

66=679